

Aus der Fachgruppe Zelluläre Neurowissenschaften
(Leiter: Prof. Kettenmann)
des Max-Delbrück-Centrums Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Ganten)

DISSERTATION

Räumliche Verteilung von Kalziumsignalen in Bergmanngliazellen als Antwort auf neuronale Aktivität

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herrn Dipl.-Math. Kai Mohrhagen
aus: Lübeck

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. Helmut Kettenmann

2. Prof. Dr. Robert Nietsch

3. Prof. Dr. Andreas Reichenbach

Datum der Promotion: 18. Dezember 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Gliazellen sind eine wichtige Zellgruppe im zentralen Nervensystem	6
1.2	Klassifizierung von Gliazellen	6
1.2.1	Astroglia	6
1.2.2	Oligodendroglia	7
1.2.3	Mikroglia	7
1.3	Das Kleinhirn	8
1.3.1	Funktion	8
1.3.2	Der cerebellare Cortex	8
1.4	Bergmann Gliazellen	9
1.4.1	Bergmann Gliazellen stehen in enger morphologischer Interaktion mit den Purkinjoneuronen	9
1.4.2	Bergmanngliazellen exprimieren zahlreiche Rezeptoren für Neurotransmitter	10
1.4.3	Bergmanngliazellen detektieren synaptische Aktivität	11
1.5	Allgemeine Mechanismen der Kalziumregulation in tierischen Zellen	11
1.5.1	Regulation der zytosolischen Ruhekonzentration von freien Kalziumionen	11
1.5.2	Zytosolische Kalziumsignale	12
1.6	Neurotransmitter Glutamat	13
1.6.1	Glutamatrezeptoren vom NMDA Typ	14
1.6.2	Glutamatrezeptoren vom AMPA/KainatTyp	15
1.6.3	Nachweis von Glutamat Rezeptoren im Cerebellum	16
1.7	Neuron-Glia Interaktionen	16
2	Zielsetzung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Präparation der Dünnschnitte aus dem Kleinhirn der Maus	19
3.2	Zusammensetzung der Lösungen	19
3.2.1	Herkunft der Substanzen	19
3.2.2	Zusammensetzung der Badlösung	20
3.2.3	Zusammensetzung der Pipettenlösung	21
3.3	Aufbau des Meßstandes	21
3.4	Kalziummessung mit Fura-2	22

3.4.1	Zur Anwendung des Fluoreszenzindikators Fura-2	23
3.4.2	Das Kalziummeßverfahren mit Fura-2	23
3.5	Kalziummessung mit Oregon Green Bapta 1	24
3.6	Konfokale Mikroskopie	25
3.7	Die Patch-Clamp Methode	26
3.8	Analyse von Kalziumantworten in Zellausläufern	28
3.9	Statistische Auswertung der Kalziumantworten in Bergmann Gliazellsomata	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Identifizierung der Bergmann Gliazellen im Kleinhirnschnitt	30
4.2	Kalziumsignale in Bergmann Gliazellsomata als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern	31
4.2.1	Messung der Kalziumsignale	31
4.2.2	Wahl optimaler Stimulationsparameter	36
4.2.3	Neuronale Aktivität ist notwendig für stimulationsvermittelte Kalziumantworten	40
4.2.4	TTX blockiert stimulationsvermittelte Kalziumantworten	40
4.2.5	Kalziumfreie Lösung blockiert stimulationsvermittelte Kalziumantworten	42
4.3	Die Rolle IP₃-vermittelter Kalziumreaktionen	45
4.4	Wirkung spezifischer Neurotransmitter Antagonisten	47
4.4.1	Die Rolle α 1-adrenerger Rezeptoren	49
4.4.2	Histamin	50
4.4.3	Die Rolle des H ₁ -Histaminrezeptoren	51
4.4.4	Endothelin	52
4.4.5	Die Rolle des ET _B -Rezeptor	53
4.5	Die Rolle von Glutamat bei stimulationsvermittelten Kalziumantworten	54
4.5.1	Einzelapplikationen von Glutamatrezeptor Antagonisten	54
4.5.2	Die Rolle von Glutamattransportern	61
4.5.3	Kombination von Antagonisten für Glutamat vermittelte Kalziumreaktionen	63
4.6	Verstärkung der Reaktion durch Kaliumkanal Antagonisten	66
4.6.1	Kaliumkanäle terminieren Aktionspotentiale	66
4.6.2	Blockade von Kaliumkanälen führt zur Verstärkung stimulationsvermittelter Kalziumantworten	66

4.7	Kalziumsignale in Bergmann Gliazellausläufern als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern	68
4.7.1	Darstellung der zeitlichen und räumlichen Ausbreitung des Kalziumsignals in den Ausläufern	68
5	<i>Diskussion</i>	72
5.1	Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation	72
5.1.1	[Ca ²⁺] _i Signale im Soma	72
5.1.2	kalziumsignale im Ausläufer	73
5.2	Pharmakologische Charakterisierung der Kalziumsignale	76
5.2.1	Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums	76
5.2.2	Glutamatrezeptoren	78
5.2.3	Purinozeptoren	82
5.2.4	Histaminerge Signale	83
5.2.5	Endothelinrezeptoren	84
5.3	Ausblick: Bergmann Gliazellen und Long Term Depression	85
6	<i>Zusammenfassung</i>	87
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	89

1 Einleitung

1.1 Gliazellen sind eine wichtige Zellgruppe im zentralen Nervensystem

Gliazellen sind die Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS), die keine Neuronen sind. Entdeckt wurde diese Zellgruppe 1846 von dem Berliner Pathologen Rudolf Virchow, der auch den Begriff Gliazelle (von griechisch γλῆα~ Leim) prägte (Virchow, R., 1856). Im zentralen Nervensystem des Menschen gibt es etwa 10mal mehr Gliazellen als Neurone. Dabei beanspruchen Gliazellen ca. 50% des Volumens des menschlichen ZNS. Trotzdem sind Gliazellen erst in jüngster Zeit Gegenstand intensiverer Forschung geworden. Dies lag vor allem an der historischen Auffassung, daß Gliazellen nicht an der Signalübertragung beteiligt sind und Hilfsfunktionen für die Neurone übernehmen (Golgi, C., 1885; His, 1889; Lugaro, 1907, Ramon y Cajal, 1907). Neuere Veröffentlichungen haben gezeigt, daß Gliazellen nicht nur über ein reichhaltiges Repertoire von Rezeptoren verfügen (Bevan, S., 1990; Barres, B. A., 1991 Verkhratsky, A. und Kettenmann, H., 1996), sondern auch neuronale Aktivität detektieren (Kriegler, S. und Chiu, S. Y., 1993; Clark, B. A. und Barbour, B., 1997).

1.2 Klassifizierung von Gliazellen

Um die Gliazellen von den Neuronen abzugrenzen, nutzt man insbesondere, daß sie einerseits ihre Poliferationsfähigkeit im adulten Tier beibehalten und daß sie andererseits weder Aktionspotentiale generieren (Krnjevic, K. und Schwartz, S., 1967) noch synaptische Strukturen ausbilden. Man unterscheidet drei Gruppen von Gliazellen: Astroglia, Oligodendroglia und Mikroglia.

1.2.1 Astroglia

Astrogliazellen sind durch die Expression des intermediären Filamentproteins GFAP (glial filament acidic protein) definiert (Übersicht: Shao, Y. und McCarthy, K. D., 1994; Privat, et al., 1995). Ontogenetisch stammen Astrogliazellen vom Neuroektoderm ab. Charakteristisch für Astrogliazellen sind die intensive Kopplung durch Gap Junctions (Kettenmann, et al., 1983; Übersicht: Dermietzel, R. und Spray, D. C., 1993), die sowohl Astrogliazellen untereinander als auch Astrogliazellen mit Oligodendrogliazellen (Kettenmann, H. und Ransom, B. R., 1988) verbinden. Sie

bilden weitverzweigte Ausläufer, die einerseits an Blutgefäße grenzen und andererseits neuronale Strukturen berühren. Die funktionelle Bedeutung dieser Morphologie liegt in der Fähigkeit, die Eigenschaften der Bluthirnschranke an die Aktivität der angrenzenden Neurone anzupassen (Risau, W. und Wolburg, H., 1990). Darüber hinaus erhalten sie die neuronale Erregbarkeit, indem sie das Kalium, das sich durch neuronale Aktivität im Extrazellulärraum sammelt, puffern („spatial buffering“, Orkand, R. et al., 1966; Walz, W., 1987). Sie schützen Neurone unter anderem dadurch, daß sie den Neurotransmitter Glutamat aufnehmen, der in hohen Konzentrationen neurotoxisch wirkt (Schousboe, et al., 1997). Der Transmitter wird in der Astrogliazelle zu Glutamin verstoffwechselt, das von Neuronen wieder zu Glutamat recycelt wird (Schousboe, et al., 1977).

1.2.2 Oligodendroglia

Oligodendrozyten myelinisieren die Fasern im zentralen Nervensystem und sind somit in ihrer Funktion vergleichbar den Schwannzellen des peripheren Nervensystems (Übersicht: Hildebrand, et al., 1994; Hildebrand, et al., 1993). Wie Astrogliazellen sind sie neuroektodermalen Ursprungs (Levison, S. W. und Goldman, J. E., 1993; Cameron, Curry P. und Le, Douarin NM., 1995). Außerdem existieren nicht myelinisierende Oligodendrozyten, deren Funktion derzeit noch unbekannt ist. Die immunhistochemische Charakterisierung stellt sich nicht so eindeutig dar, wie bei den Astrozyten, da man keinen Marker kennt, der durchgängig alle Entwicklungsstadien färbt. Frühe Stadien exprimieren das Antigen A2B5 (Eisenbarth, G. et al., 1979), spätere Stadien der zeitlichen Reihenfolge nach die Antigene O4, O1 (Sommer, I. und Schachner, M., 1981), O10 (Kuhlmann, Krieg et al., 1988; Jung, et al., 1996). Gleichzeitig mit O10 werden die typischen Myelinproteine wie z.B. myelin basic protein (MBP; Hildebrand, et al., 1993) exprimiert. Im Falle einer Rückenmarksläsion können Myelinproteine (NI 35/250) eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung der Regeneration spielen (Schwab, M. et al., 1993; Schwab, M. E. und Bandtlow, C. E., 1994; Schwab, M. et al., 1993).

1.2.3 Mikroglia

Mikrogliazellen sind die immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems (Kreutzberg, G. W., 1966). Wie Monozyten sind sie vermutlich mesodermalen Ursprungs (Rio-Hortega P del., 1921). Sie wandern erst in einer späten Phase der

Entwicklung des Gehirns über den Corpus callosum ein (Leong, S. K. und Ling, E. A., 1992). Charakteristisch ist die Bindung des Lektins IB4 (Streit, W. J. und Kreutzberg, G. W., 1987). Allerdings binden alle Marker für Mikroglia ebenso an Epithelzellen und Monozyten. Eine Unterscheidung mit einer Färbung von Mikrogliazellen und Monozyten, die in einer pathologischen Situation in Verbindung mit einer Verletzung der Bluthirnschranke einwandern, wird dadurch unmöglich gemacht. Nach Streit (Streit, W. et al., 1988) kann man die Mikrogliazelle in verschiedenen Stadien beobachten. Während der Einwanderung in das Gehirn spricht man von der amöboiden Form. Im gesunden Gehirn dagegen stellen sich die Zellen stark verzweigt (ramifiziert) dar (Streit, W. et al., 1988). Man bezeichnet diese Form als „resting microglia“, da man davon ausgeht, daß die Zellen im wesentlichen auf ihre Aktivierung durch einen pathologischen Stimulus warten. Tritt ein solcher Stimulus auf, so geht die Zelle erst in den aktivierten (sich amöboid fortbewegenden) Zustand und später in einen phagozytotischen Zustand über (Streit, W. et al., 1988).

1.3 Das Kleinhirn

1.3.1 Funktion

Das Kleinhirn (Cerebellum) variiert in den verschiedenen Wirbeltierklassen sehr deutlich. Während es bei vielen Amphibien und Reptilien kaum ausgeprägt ist, fällt das Kleinhirn von Säugetieren durch seine Ausdehnung und durch seine ausgeprägte Faltung auf (Übersicht: Altman, J. und Bayer, S. A., 1997). Im Allgemeinen werden ihm Funktionen in der sensomotorischen Koordination, bei der Steuerung des Muskeltonus und für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zugesprochen (Duus, P., 1995).

1.3.2 Der cerebellare Cortex

Der cerebellare Cortex besteht aus einer vielfach gefalteten Dreifachschichtung. Von außen nach innen sind dies die Molekularschicht, die Purkinjezellschicht und die Körnerzellschicht. Zentrales Element dieser Struktur sind die Purkinjezellen, deren Dendritenbäume innerhalb der Molekularschicht aufgespannt sind. Der Dendritenbaum einer Purkinjezelle liegt in einer Ebene, wobei die Dendritenbäume benachbarter Purkinjezellen nahezu parallele Ebenen aufspannen. Die Purkinjezellen projizieren mit ihrem inhibitorischen Neurotransmitter GABA in die Kleinhirnkerne

(Duus, P., 1995). Ihre Eingänge erhalten sie unter anderem durch die Parallelfasern, die ihren Name durch ihren Verlauf in der Molekularschicht erhalten. Sie werden durch die Axone der Körnerzellen gebildet. Eine Körnerzelle entsendet ihr Axon auf direktem Wege in die Molekularschicht, wo es sich zweiteilt. Die Äste verlaufen parallel zur Purkinjezellschicht, senkrecht auf den Dendritenbäumen der Purkinjezellen (Chan-Palay, V. und Palay, S. L., 1987). Eine Körnerzelle innerviert zahlreiche Purkinjezellen. Ihren Eingang erhalten die Körnerzellen von den Moosfasern, die ihren Ursprung in den Kernen der Pons haben. Weiteren Eingang erhalten die Purkinjezellen von den Kletterfasern, die aus dem Nucleus olivae inferior stammen. Diese Fasern durchqueren die Körnerzellschicht, um dann an dem Dendritenbaum der Purkinjezellen buchstäblich emporzuklettern. Genauso wie die Parallelfasern haben auch die Moosfasern exzitatorische Wirkung. Die Verbindungen der Interneurone (Golgi-, Korb-, Sternzellen) des cerebellaren Kortex sind ausschließlich inhibitorisch.

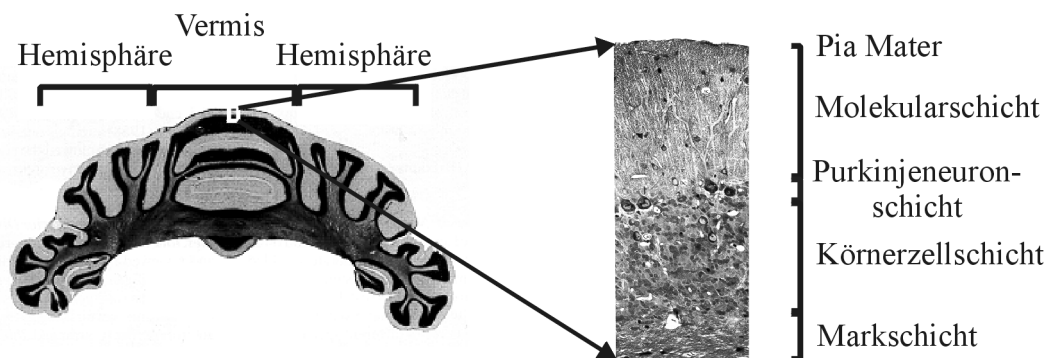


Abbildung 1: Links: Nisselfärbung eines Frontalschnittes eines Kleinhirns von der Ratte. Man erkennt die Dreigliederung in den Vermis und zwei lateral gelegene Hemisphären. Rechts: Vergrößerte Ansicht eines Ausschnitts aus der Molekularschicht. Von außen nach innen folgen die Schichten Pia Mater, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, Körnerzellschicht und Markscheit. Die Bergmann Gliazellen haben ihre Somata in der Purkinjezellschicht und senden 3-6 Ausläufer durch die Molekularschicht bis an die Pia Mater (Färbungen aus Altman, J. und Bayer, S. A., 1997).

1.4 Bergmann Gliazellen

1.4.1 Bergmann Gliazellen stehen in enger morphologischer Interaktion mit den Purkinjeuronen

Die Bergmann Gliazelle ist eine spezielle Form der Astroglia. Sie wurde 1857 durch Carl Bergmann entdeckt. Die Zellkörper der Bergmann Gliazellen befinden sich in der Purkinjezellschicht. Sie sind der einzige Typ von Astrogliazellen der Purkinje- und Molekularschicht (Reichenbach, et al., 1995). Zwei bis sechs

Ausläufer befinden sich in radialer Richtung in der Molekularschicht, wo sie den Dendriten der Purkinjeneurone folgen (Golgi, C., 1885; Fananas, J. und Ramón y Cajal., 1916; Chan-Palay, V. und Palay, S. L., 1972; Das, G. D., 1976; Shiga, et al., 1983; Shiga, et al., 1983; Hanke, S. und Reichenbach, A., 1987). Es teilen sich von einem Hauptausläufer große blattähnliche („leave like“) Unterausläufer ab. Der Begriff „blattähnlich“ zielt auf den Umstand, daß ein großes Gebilde über einen relativ schmalen Steg mit dem Hauptausläufer verbunden ist. Die Komplexität der Verzweigthet steigt dabei vom Hauptausläufer zu den Anhängen. Neuere Untersuchungen, die aus elektronenmikroskopisch gewonnenen Bildern die dreidimensionale Struktur rekonstruieren, zeigen ein Volumen zu Oberflächenverhältnis von 4.5 μm im Hauptausläufer gegenüber 25 μm in den Anhängen (Grosche, et al., 1999). In letzter Konsequenz umschließen die Ausläufer der Bergmannglia die Synapsen der Parallelfasern auf den dendritischen Spines der Purkinjeneurone und bilden eine gliale Hülle (Chan-Palay, V. und Palay, S. L., 1987; Grosche, et al., 1999).

1.4.2 Bergmanngliazellen exprimieren zahlreiche Rezeptoren für Neurotransmitter

Bergmanngliazellen exprimieren mehrere funktionelle Neurotransmitterrezeptoren. So werden Rezeptoren für Endothelin (Endothelin_B Rezeptor, Tuschick, et al., 1997), ATP (P_{2Y} Rezeptor, Kirischuk, et al., 1995), GABA (GABA_A-Rezeptor, nur in jüngeren Tieren, Müller, et al., 1994), Adrenalin, Noradrenalin (α 1-Adrenorezeptoren, Kirischuk, et al., 1996), Glutamat (ionotrope Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ, Müller, et al., 1992, vom NMDA Typ Müller, et al., 1993 und metabotrope Rezeptoren vom Typ mGluR1 und mGluR5 (mGluR allgemein: Lopez, Colome AM, Ortega, et al., 1997) und Histamin (H1 Rezeptor, Kirischuk, et al., 1996) auf Bergmanngliazellen beschrieben. Rezeptoren für Acetylcholin, Aspartat, Bradikinin, Dopamin, Glyzin, Oxytozin, Serotonin, Somatostatin, Substanz P, Taurin und Vasopressin konnten nicht nachgewiesen werden (Tuschick, S., 1997). Diese Rezeptorausstattung spiegelt das Rezeptorrepertoire der Purkinjeneurone wider (Tuschick, S., 1997).

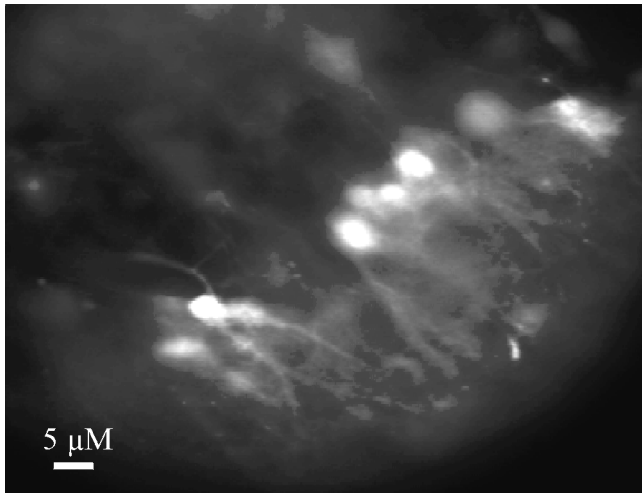


Abbildung 2: Bergmann Gliazellen mit dem Farbstoff Fura-2_AM im „bulk loading“-Verfahren gefärbt. Man erkennt die Zellsomata und proximale Anteile der Ausläufer.

1.4.3 Bergmanngliazellen detektieren synaptische Aktivität

Die elektrische Stimulation der Parallelfasern führt zu einem Einwärtsstrom über die Bergmann Gliazellmembran, wie Clark und Babour mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode zeigen konnten (Clark, B. A. und Barbour, B., 1997). Durch eine pharmakologische Charakterisierung konnte gezeigt werden, daß der Einstrom hauptsächlich durch ionotrope Glutamatrezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ und durch Glutamattransporter hervorgerufen wird.

1.5 Allgemeine Mechanismen der Kalziumregulation in tierischen Zellen

1.5.1 Regulation der zytosolischen Ruhekonzentration von freien Kalziumionen

Im Zytosol von Gliazellen findet man eine sehr niedrige Konzentration von entweder 30-40 nM oder 200-400 nM freier Kalziumionen (Verkhratsky, et al., 1998). Allerdings kann die zytosolische Kalziumkonzentration zeitlich begrenzt auf ein Vielfaches ansteigen. Solche Ereignisse nennt man Kalziumsignal oder Kalziumtransient. Kalziumsignale können die Auslösung bzw. die Modulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse bewirken (Clapham, D. E., 1995; Kostyuk, P. und Verkhratsky, A., 1994).

Das Konzentrationsgefälle von 1.2-1.5 mM freier Kalziumionen im Extrazellulärraum (Heinemann, et al., 1977) zum Zytosol wird durch die Aktivität

verschiedener kalziumbindender Proteine (Pufferproteine wie z.B. Calbindin, Calsequestrin und Parvalbumin oder Effektorproteine wie z.B. Calmodulin, Proteinkinas C und Calneurin B, Übersicht: Heizmann, C. W. und Hunziker, W., 1991) und eine Reihe Energie aufwendender Pumpmechanismen aufrechterhalten (Lytton, J. und Nigam, S. K., 1992).

Zelluläre Kompartimente können ebenfalls als Kalziumspeicher dienen. So erzeugt die SERCA-Pumpe (sarcoendoplasmatic reticulum calcium pump) im Lumen des endoplasmatischen Retikulum eine sehr hohe Kalziumkonzentration (Übersicht: Pozzan, et al., 1994). Daher kann das endoplasmatische Retikulum als Quelle von Kalziumsignalen dienen. Weitere intrazelluläre Kalziumspeicher sind Mitochondrien und der Golgi-Apparat (Übersicht Finkbeiner, S. M., 1993).

1.5.2 Zytosolische Kalziumsignale

Ein Kalziumsignal kann auf zwei Wegen zustande kommen - zum einen durch den Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum und zum anderen durch die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern.

Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum erfolgt durch das Öffnen von spannungs- oder ligandengesteuerten Kanälen in der Plasmamembran. Durch eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration (Kirischuk, et al., 1997) kann ein Ca^{2+} Einstrom auch durch die Umkehrung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers zustandekommen. Die Aktivierung von Kalziumsignalen wird außerdem durch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum durch sogenannte SOCC-Kanäle (store operated calcium channels) gewährleistet, die durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher aktiviert werden (Toescu, E. et al., 1998). Die intrazellulären Speicher werden dann aus dem zytosolischen Ca^{2+} wiederaufgeladen. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration kann auch durch die Freisetzung von Ca^{2+} Ionen aus intrazellulären Speichern erfolgen. In allen eukaryotischen Zellen existieren spezialisierte Zellorganellen mit der Funktion eines intrazellulären Kalziumspeichers (endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Kernhülle). Diese Organellen sind zur Speicherung hoher Konzentrationen von Kalziumionen fähig und setzen diese zur Generierung von intrazellulären Kalziumsignalen frei. Am besten untersucht sind Inositol-3-Phosphat-sensitive Kalziumspeicher. In diesen Kalziumspeichern wird der Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen

durch die Aktivierung metabotroper Membranrezeptoren bewirkt. Diese bewirken die Synthese von Inositol-3-Phosphat (IP_3), welches dann mit spezifischen Rezeptoren an der Membran des endoplasmatischen Retikulum wechselwirkt und zum Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen führt (Streb, et al., 1983).

Um das Kalziumsignal zu terminieren, werden die Kalziumionen in den Extrazellulärraum ausgeschleust und in die intrazellulären Kalziumspeicher zurückgeführt. Der Ausstrom von Ca^{2+} in den Extrazellulärraum wird durch in der Plasmamembran befindliche Kalzium-ATPasen im Antiport mit Protonen sowie Na^+/Ca^{2+} -Austauscher bewirkt. Die Rückführung des Kalzium in das endoplasmatische Retikulum geschieht durch die SERCA (sarcoendoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase) Kalziumpumpen. Die Speicherung des Ca^{2+} in den Mitochondrien geschieht durch Transport mit Hilfe des elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran, der durch die Elektronenübertragung während der Zellatmung entsteht. Eine wichtige Rolle bei der Festlegung der räumlichen Ausdehnung des Kalziumsignals in der Zelle spielen außerdem spezielle kalziumbindende Proteine wie z.B. Calmodulin, die mit hoher Effektivität freie Kalziumionen binden und somit ihre Diffusion durch das Zytoplasma verhindern.

1.6 Neurotransmitter Glutamat

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Seit der Entdeckung des ersten funktionellen Glutamatrezeptors (GluR1, AMPA Rezeptor) durch Hollmann (Hollmann, et al., 1989) auf dem Wege der Expressions Klonierung (Masu, et al., 1991) sind zahlreiche weitere ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren durch Sequenzanalogien gefunden worden (zur Übersicht: Hollmann, M. und Heinemann, S., 1994). Außerdem sind verschiedene Transportertypen bekannt (zur Übersicht: Vandenberg, R. J., 1998). Zusätzlich zu seiner Funktion als Neurotransmitter spielt Glutamat in der Entwicklung (Cline, H. T. und Constantine, Paton M., 1989; Kleinschmidt, et al., 1987), bei LTP („long term potentiation“) und bei LTD („long term depression“) (zur Übersicht: Rison, R. A. und Stanton, P. K., 1995; Kano, M., 1994; Dragunow, M., 1996; Daniel, et al., 1998; Levenes, et al., 1998) eine Schlüsselrolle. Glutamat ist in pathologischen Situationen wie z.B. epileptischen Anfällen (Babb, T. et al., 1998; Mathern, G. et al., 1998),

Schizophrenie (Catts, S. et al., 1997), Hypoxie und Ischämie (Budd, S. L., 1998; Vandenberg, R. J., 1998) wichtig, da es in hohen Konzentrationen neurotoxisch wirkt (Montal, M., 1998; Olney, J. W., 1994; Olney, J. W., 1994). Kalziumeinstrom durch Glutamatrezeptoren gilt als Mechanismus für die Neurotoxizität von Glutamat (Choi, D. W., 1988). Im folgenden wird die von Hollmann und Heinemann (Hollmann, M. und Heinemann, S., 1994) eingeführte Notation für Glutamat Rezeptoren verwendet.

1.6.1 Glutamatrezeptoren vom NMDA Typ

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind oligomere Membranproteine, die einen kationselektiven Kanal bilden. Rezeptoren vom NMDA-Typ setzen sich homo- oder heteromer aus den NMDAR1 und NMDAR2A-NMDAR2D genannten Untereinheiten zusammen. Der NMDA-Rezeptor ist der einzige bekannte ligandengesteuerte Ionenkanal, dessen Öffnungswahrscheinlichkeit unter physiologischen Bedingungen von dem Membranpotential abhängt (Hollmann, M. und Heinemann, S., 1994). Der Kanal wird durch zahlreiche Mechanismen reguliert. Zum einen wird der Kanal durch ein Magnesiumion in der Membranpore blockiert, das erst bei einer Depolarisierung der Zelle aus dem Kanal entweicht. Desweiteren konnte eine regulatorische Bindungsstelle für Glyzin nachgewiesen werden (Kleckner, N. W. und Dingledine, R., 1988). Dieser Kanal erfüllt die 1949 von Donald Hebb in Verbindung mit einem Modell für Lernvorgänge aufgestellten Forderung nach einem hebbianischen Molekül. Zudem ist gezeigt worden, daß die Aktivität des NMDA-Rezeptors sowohl für die Induktion LTP („long term potentiation“) als auch für die Synaptogenese notwendig ist. Für diese mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebrachten Vorgänge sind insbesondere durch NMDA-Rezeptoren vermittelte postsynaptische Kalziumsignale ausschlaggebend. Für die Ionenpermeabilität der Pore und deren Regulation durch Kalzium ist die Zusammensetzung aus den verschiedenen Untereinheiten und deren Splicevarianten verantwortlich (Koltchine, V. et al., 1996). Im Laufe der Entwicklung ändert sich die Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten, so daß im jungen Tier, in Zeiten hoher synaptischer Plastizität, Zusammensetzungen mit hoher Permeabilität für Kalzium bevorzugt sind (zur Übersicht: Constantine, Paton M., 1994). Kalziumeinstrom durch den NMDA-Rezeptor kann zur Freisetzung von NO führen. NO ist ein frei durch Zellmembranen diffundierender Botenstoff, mit einer

Reichweite von einigen Zelldurchmessern und einer Halbwertszeit im Bereich von Sekunden (zur Übersicht: Dawson, T. M. und Snyder, S. H., 1994; Garthwaite, J. und Boulton, C. L., 1995). NO wird als retrograder Messenger in Verbindung mit LTP diskutiert. So ist gezeigt, daß NO in dem Parallelfaser-Purkinje-System zu einer Verminderung der Transmitterfreigabe führt. Außerdem haben Sorg et al. (Sorg, et al., 1997) gezeigt, daß NO in kultivierten Astrozyten zur Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führen kann.

1.6.2 Glutamatrezeptoren vom AMPA/KainatTyp

Rezeptoren vom nicht NMDA-Typ teilen sich in zwei Klassen auf: AMPA- und Kainaterezeptoren. AMPA-Rezeptoren sind Homo- oder Heteromere aus den Untereinheiten GluR1-4 (Burnashev, et al., 1992, Hume, R. et al., 1991, Verdoorn, T. et al., 1991). Die Untereinheiten GluR1-4 existieren in jeweils zwei Formen, die durch alternatives Splicing erzeugt werden (Sommer, et al., 1990). An Purkinjezellen konnte man zeigen, daß die sogenannten ‚flip‘ und ‚flop‘ Varianten der Untereinheiten im Laufe der Entwicklung in verschiedenem Maße exprimiert werden (Monyer, et al., 1991). In Purkinjezellen junger Mäuse liegt überwiegend die ‚flip‘ Variante vor, die Glutamat effektiver bindet, als die ‚flop‘ Variante (Sommer, et al., 1990). Im Falle der Untereinheit GluR2 ist außerdem eine im Zytosol stattfindende Modifikation der RNA, das RNA-Editing, nachgewiesen (Sommer, et al., 1991). Die Rezeptoren vom Kainat-Typ setzen sich aus Untereinheiten der Proteinfamilien GluR5-7 und KA1-2 zusammen (Herb, et al., 1992; Howe, J. R., 1996; Swanson, G. et al., 1996). Physiologisch fallen die AMPA-Rezeptoren durch ihre schnelle Desensitivierung bei Stimulation mit Glutamat oder AMPA auf (Kiskin, N. et al., 1986). Kainat stellt einen nicht desensitivierenden Agonisten dar. Funktionell wird die schnelle Desensitivierung mit der Modulation postsynaptischer Reaktion auf synaptische Aktivität in Verbindung gebracht (Dudel, et al., 1988; Trussell, L. et al., 1988; Tang, C. et al., 1989; Trussell, L. O. und Fischbach, G. D., 1989). Die funktionelle Bedeutung der differenziellen Expression der GluR2 und GluR4 Untereinheiten ist in der unterschiedlichen Permeabilität für Kalziumionen und in Unterschieden in der Desensitivierungsgeschwindigkeit zu suchen (Geiger, J. et al., 1995). Die Kanäle mit der GluR2 Untereinheit zeichnen sich durch ein langsames Zeitverhalten (Zeitkonstanten 10-15ms) bei geringer Kalziumpermeabilität (Mayer,

M. L. und Westbrook, G. L., 1987; Colquhoun, et al., 1992; Hestrin, S., 1993; Jonas, P. und Spruston, N., 1994) aus, während Kanäle mit der GluR4 Untereinheit schneller schalten (Zeitkonstanten 3-6ms) und hohe Kalziumpermeabilität (Hestrin, S., 1993; Jonas, P. und Spruston, N., 1994; Koh, D. et al., 1995) zeigen. Das RNA-Editing der GluR2 Untereinheit führt zu einer reduzierten Kalziumpermeabilität gegenüber der nicht editierten Form (Hollmann, et al., 1991; Hume, R. et al., 1991; Burnashev, et al., 1992).

1.6.3 Nachweis von Glutamat Rezeptoren im Cerebellum

In Bergmann Gliazellen sind die Rezeptoruntereinheiten GluR1 und GluR4 des AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole) selektiven Glutamatrezeptors sowohl mit immunhistochemischen Methoden (Ripellino, J. et al., 1998, Jaarsma, et al., 1995) als auch mit Hilfe der ‚in Situ‘-Hybridisierung (Day, N. et al., 1995) nachgewiesen worden. In Körnerzellen und in Purkinjoneuronen konnte die mRNA der Untereinheiten GluR1 und GluR2, nicht aber die von GluR3 oder GluR4 gefunden werden (Day, N. et al., 1995). Die Untereinheiten GluR2/3, GluR5, GluR6, GluR7 und NR-1, NR-2, KA-1, KA-2 von Glutamatrezeptoren des NMDA (non-N-methyl-D-aspartate)- bzw. Kainat-Typs konnten in denselben Studien nicht nachgewiesen werden.

Physiologische Studien auf der Basis von Ganzzellaufzeichnungen und Fura-2-fluorometrischen Messungen zeigen, daß Bergmann Gliazellen im Gegensatz zu Purkinjoneuronen Kainat-Rezeptoren mit einer relativ hohen Kalziumleitfähigkeit exprimieren (Tempia, et al., 1996).

1.7 Neuron-Glia Interaktionen

Die Bergmann Gliazelle ist ein Vertreter der Astrogliazellen. Diese Zellen bedecken nahezu vollständig die Bereiche des Neurons, auf denen keine Synapsen terminieren. Diese enge morphologische Interaktion läßt vermuten, daß auch eine funktionelle Interaktion stattfindet. Insbesondere die Untersuchung von intrazellulären Kalziumsignalen in Astrogliazellen hat hier Aufschlüsse gebracht. So zeigen Astrogliazellen im optischen Nerv Kalziumantworten auf die elektrische Stimulation des Nerven (Kriegler, S. und Chiu, S. Y., 1993). Carsten Ohlemeyer hat im Rahmen seiner Dissertation somatische Kalziumreaktionen von Gliazellen als Antwort auf

elektrische Stimulation des Corpus callosum gezeigt (Ohlrmeyer, C., 1996). Elektrophysiologische Untersuchungen an Bergmann Gliazellen weisen eine Depolarisation der Zellen während elektrischer Stimulation der Parallelfasern nach (Clark, B. A. und Barbour, B., 1997). Kalziumtransienten in Ausläufern von Bergmann Gliazellen wurden von Grosche et. al. (Grosche, et al., 1999) auf elektrische Stimulation der Parallelfasern hin beobachtet.

Die oben genannte Arbeit beschäftigt sich mit der Detektion neuronaler Aktivität durch Astrogliazellen. Eine neuere Untersuchung konnte nachweisen, daß Kalziumwellen im Astroglia-synzytium die Übertragungseffizienz neuronaler Verbindungen erhöhen können (Newman, E. A. und Zahs, K. R., 1998).

Ein weiteres, wichtiges Beispiel für Neuron-Glia Interaktion ist die Beschleunigung der Reizleitung durch Schwannzellen bzw. Oligodendrogliazellen durch die Myelinbildung. Wie entscheidend diese Funktion ist, sieht man bei degenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Multiplen Sklerose (Storch, M. und Lassmann, H., 1997).

2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, die Kalziumsignale, die als Antwort auf elektrischer Stimulation der Parallelfasern in der Bergmanngliazelle entstehen, in ihrem zeitlichen Verhalten zu charakterisieren und ihren Ursprung zu untersuchen. Um regionale Unterschiede innerhalb der Zelle zu bestimmen, soll das Verhalten des Zellkörpers dem des Ausläufers gegenübergestellt werden.

Auf pharmakologischem Wege soll untersucht werden, welche der bekannten kalziuminduzierenden Rezeptoren (Tuschick, S., 1997) auf der Bergmannglia, an der Detektion synaptischer Aktivität beteiligt sind.

In dieser Arbeit sollen folgende Sachverhalte geklärt werden:

- Es soll untersucht werden, ob Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern mit Kalziumsignalen reagieren und ob es Unterschiede hinsichtlich der Kalziumantwort im Ausläufer und im Soma gibt.
- Durch die Anwendung von Antagonisten neuronaler Aktivität soll festgestellt werden, ob die durch elektrische Stimulation der Parallelfasern induzierten Kalziumsignale durch neuronale Aktivität ausgelöst werden.
- Es soll der Einfluß der Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums auf die durch elektrische Stimulation der Parallelfasern ausgelösten Kalziumsignale bestimmt werden.
- Mit Hilfe spezifischer Antagonisten soll die Beteiligung von Neurotransmittern geklärt werden, die Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen induzieren. Untersucht werden sollen die Transmitter: Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Endothelin, Adenosin-tri-Phosphat und Glutamat.
- Das zeitliche und räumliche Verhalten von Kalziumantworten im Ausläufer soll dem im Zellkörper gegenüber gestellt werden. Dazu soll eine geeignete Darstellung der Signale entwickelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Präparation der Dünnschnitte aus dem Kleinhirn der Maus

Die Kleinhirnschnitte wurden aus 20 bis 40 Tage alten Mäusen (P20 – P40) des Stammes NMRI (Naval Medical Research Institute) (modifiziert nach Llano, et al., 1991) gewonnen.

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und die Kopfhaut entfernt. Der Schädel wurde dann einseitig lateral entlang der Schädelbasis aufgetrennt und rostral der Sutura lamdoidea (Naht zwischen dem Hinterhauptsbein und den beiden Scheitelbeinen) mit einem Frontalschnitt geöffnet. Der hintere Teil des Schädeldaches wurde mit Hilfe einer Pinzette abgehoben und das Kleinhirn sowie ein kaudal gelegener Teil des Großhirns in eiskalte Badlösung überführt. Der verbliebene Teil des Großhirns wurde abgetrennt und das Kleinhirn wurde mit der so entstandenen frontalen Schnittfläche mit Cyanmethacrylatkleber (Sekunden Alleskleber, Loctite, München) auf einem angerauhten Glasblock befestigt. Diese Anordnung wurde in der Schneidewanne eines Vibratoms (Vibracut, FTB, Bensheim) eingespannt und mit eiskalter Badlösung bedeckt. Alle verwendeten Gewebeschnitte wurden als Frontalschnitte aus dem Kleinhirn mit einer Stärke von 150 µm hergestellt.

Nach der Präparation wurden die Schnitte in Badlösung (s. unten) bis zu 6 Stunden bei Raumtemperatur (22-25°C) aufbewahrt. Die Schnitte wurden in mit Bicarbonat begaster Badlösung in einem Vorratsgefäß auf einem Netz aus Nylonfäden gelagert, so daß sie von allen Seiten mit Badlösung umspült wurden. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (22-25 °C) durchgeführt.

3.2 Zusammensetzung der Lösungen

3.2.1 Herkunft der Substanzen

Die folgenden Substanzen wurden in konzentrierter Form in geeigneten Lösungsmitteln gelöst. Für die Experimente wurden diese Lösungen mit Badlösung verdünnt. Die folgende Tabelle zählt das Lösungsmittel, die Verdünnung, die Lagerbedingungen und den Lieferanten der Substanzen auf.

Substanz	Lieferant	Stammlösung	Verdünnung	Lagerung
TTX	Tocris	1 mM in H ₂ O	1:1000	+4°C
Thapsigargin	Tocris	1 mM in DMSO	1:1000	-20°C
Prazosin	Tocris	1 mM in Ethanol	1:1000	-20°C
BQ788	Calbiochem	100 µM in H ₂ O	1:1000	-20°C
BQ3020	Calbiochem	100 µM in 2.5% NH ₄ OH	1:1000	-20°C
E4CPG	Tocris	100 mM in 0.11 M NaOH	1:1000	-20°C
AIDA	Tocris	100 mM in 0.11 M NaOH	1:1000	-20°C
CPCCO	Tocris	100 mM in DMSO	1:1000	-20°C
PhCCC	Tocris	100 mM in DMSO	1:1000	-20°C
CNQX	Tocris	20 mM in H ₂ O	1:1000	-20°C
l-PDC	Tocris	100 mM in 0.1 M NaOH	1:1000	-20°C
ATP	Tocris		1:1000	-20°C
4-AP	Tocris	500 mM in Badlösung	1:1000	-20°C
PPADS	Tocris	100 mM in H ₂ O	1:1000	-20°C
Reactive blue 2	Tocris	100 in H ₂ O	1:1000	-20°C
DMSO	Sigma		1:1000	Raumtemperatur
Fura-2-AM	Molecular Probes	5 mM in DMSO	1:1000	-20°C
Oregon-Green Bapta-1	Molecular Probes	2.5 mM in H ₂ O	1:1000	-20°C

3.2.2 Zusammensetzung der Badlösung

Die Badlösung wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt und setzte sich wie folgt zusammen:

Badlösung

NaCl	134,0 mM
KCl	2,5 mM
CaCl ₂	2,0 mM
MgCl ₂	1,3 mM
K ₂ HPO ₄	1,25 mM
NaHCO ₃	26,0 mM
Glukose	10,0 mM

Die Lösung wurde ständig mit Bicarbonat (O₂ 95%, CO₂ 5%) begast. Der pH-Wert wurde dadurch auf 7,4 eingestellt.

Für die Herstellung der nominell Ca²⁺-freien Lösung wurde der CaCl₂-Anteil durch MgCl₂ ersetzt und 0,5 mM EGTA zugesetzt (alle Substanzen Merck, Darmstadt).

Dazu wurden zwei 5fach konzentrierte Vorrats-Lösungen angesetzt und bei +4°C gelagert.

Ca²⁺-freie Badlösung (Stock I)

NaCl	134,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	3,3 mM

Ca²⁺-freie Badlösung (Stock II)

K ₂ HPO ₄	1,25 mM
NaHCO ₃	26,0 mM

Die fertige Lösung wurde vor dem Experiment durch Verdünnen der Stock-Lösungen 1 (Stock I) :1 (Stock II) :3 (dest. H₂O) hergestellt. Außerdem wurden 10 mM Glukose und 0,5 mM EGTA zugegeben. Die Lösung wurde wie die Badlösung ständig mit Bicarbonat begast.

3.2.3 Zusammensetzung der Pipettenlösung

Für die Patch-Clamp-Untersuchungen wurden die Zellen mit folgender den Kalziumfarbstoff enthaltender Pipettenlösung dialysiert (nach Grosche, et al., 1999)

Pipettenlösung

KCl	150 mM
MgCl ₂	2 mM
Na ₂ ATP	3 mM
HEPES	10 mM
Oregon-Green-BAPTA-1	0,5 mM

Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von KCl auf 7,3 eingestellt und die Lösung bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Aufbau des Meßstandes

Die gesamte Meßapparatur wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Microplan, Saarbrücken) montiert und gegen elektromagnetische Störungen sowie Streulicht durch einen Faraday'schen Käfig aus Aluminiumplatten abgeschirmt. Die Präparate wurden in der Meßkammer durch ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen) mit einem Wasser-Immersionsobjektiv (LumPlanFL 40x 0.80w, Olympus) beobachtet. Um die Gewebeschnitte in der Meßkammer zu fixieren, wurde ein mit Nylonfäden bespannter U-förmig gebogener Platindraht verwendet (nach: Edwards, F. et al., 1989).

Auf dem Objektisch des Mikroskops wurde eine Meßkammer aus Plexiglas mit Glasboden montiert. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Gilson) wurde ständig

Badlösung aus einem Vorratsbehälter in eine Vorkammer der Meßkammer gepumpt. Über einen Überlauf gelangte die Badlösung in die Meßkammer. Auf der gegenüberliegenden Seite des Einlaufes befand sich ein Ablauf, aus dem mit Hilfe der Peristaltikpumpe die überständige Lösung absaugt wurde. Durch saugfähiges Papier konnte ein gleichmäßiger Pegel der Badlösung in der Meßkammer garantiert werden. Die Durchflußrate konnte über die Drehzahl der Peristaltikpumpe geregelt werden und betrug ca. $2\text{--}4\text{ ml min}^{-1}$. Durch den Wechsel der Vorratsbehälter können pharmakologisch wirksame Substanzen appliziert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sich alle Konzentrationsangaben auf die eingeleiteten Lösungen beziehen, aber nicht unbedingt die Konzentration an den Zellen angeben.

3.4 Kalziummessung mit Fura-2

Die Konzentration freier Kalziumionen läßt sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 messen, da das Exzitationsspektrum dieses Ca^{2+} Chelators von der Bindung freier Kalziumionen abhängig ist: Das Maximum des Exzitationsspektrums liegt für die kalziumgebundene Form von Fura-2 bei $\lambda_1 = 340\text{ nm}$, für die kalziumfreie Form bei $\lambda_2 = 380\text{ nm}$; die maximale Emission erfolgt in beiden Fällen bei $\lambda_E = 510\text{ nm}$. Als eigentliche Meßgrößen dienen die Fluoreszenzintensitäten F_1 und F_2 , die bei Anregung mit den Wellenlängen λ_1 und λ_2 emittiert werden. Für ein gegebenes optisches System verhält sich der Quotient $R = F_1/F_2$ proportional zur Konzentration freier Kalziumionen.

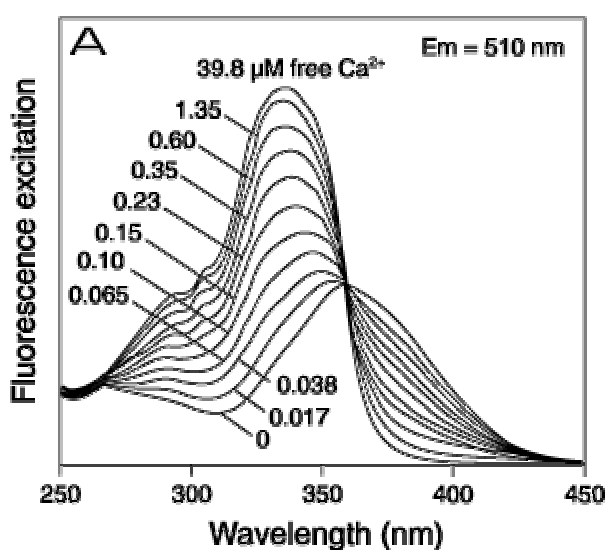


Abbildung 3: Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Emissionswellenlänge $\lambda_E = 510 \text{ nm}$ in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und verschiedenen Kalziumkonzentrationen.

Die Bildung des Quotienten R (ratiometrische Methode) bietet den Vorteil, daß Störungen des Fluoreszenzsignals, die auf Konzentrationsänderungen des Farbstoffs beruhen, durch die Division der konzentrationsabhängigen Terme entfallen. (Gryniewicz, et al., 1985).

3.4.1 Zur Anwendung des Fluoreszenzindikators Fura-2

Zur Messung der intrazellulären Konzentration freier Kalziumionen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) muß Fura-2 in das Zytosol der zu untersuchenden Zellen eingebracht werden. Hierzu bietet sich die folgende Methode an:

Fura-2 kann als lipophiler, nicht fluoreszierender, membranpermeabler Acetoxymethylester (Fura-2 AM) in der Badlösung appliziert werden. Der Farbstoff kann in dieser Form durch die Zellmembran in das Zytosol diffundieren, wo die Esterbindungen durch zelleigene Esterasen aufgespalten werden. Der nun polarisierte Farbstoff ist in dieser Form membranimpermeabel und fluoreszent. Diese Methode wird als „bulk loading“ bezeichnet (Kirischuk, S. und Verkhratsky, A., 1996).

Das Laden der Zellen erfolgte durch Inkubation der Kleinhirnschnitte für 20 min bei 37°C (96 % Luftfeuchte, 5 % CO_2) in Badlösung, die 10 μM Fura-2 AM (Stammlösung: 5 mM in DMSO) und 0,02% Pluronic F-127 enthielt (beide Substanzen Molecular Probes, Eugene, USA). Nach dem Laden wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert. Auswertbare Fluoreszenzintensitäten ließen sich mit fortschreitender Hydrolyse der Esterbindungen nach weiteren 30 min messen.

Nach diesem Protokoll lassen sich Bergmann Gliazellen erfolgreich mit Fura-2 AM beladen. Benachbarte Purkinje-Zellen lassen sich erst ab einer Inkubationszeit von 40 min mit Fura-2 beladen. Für Körnerzellen reicht eine Ladezeit von 10 min aus. Die zu erreichende zytosolische Fura-2 Konzentration liegt bei 20-30 μM . Bei diesen niedrigen Werten sind Nebeneffekte vernachlässigbar, die auf den kalziumpuffernden Eigenschaften des Farbstoffs beruhen (Kirischuk, S. und Verkhratsky, A., 1996).

3.4.2 Das Kalziummeßverfahren mit Fura-2

Die Untersuchung von Kalziumantworten in Bergmann Gliazellsomata erfolgte mit einem Kalzium-Imaging-System. Die Präparate wurden durch einen Monochromator (Polychrome II, T.I.L.L. Photonics, Planegg) mit den Wellenlängen $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und

$\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ beleuchtet. Die Messung der Fluoreszenzsignale F_1 und F_2 erfolgte mit einer Peltierelement-gekühlten CCD-Kamera (IMAGO CCD, T.I.L.L. Photonics, Planegg, maximale Bildauflösung 640x480 Pixel). Die Steuerung des gesamten Systems sowie die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Vision 2.06 (T.I.L.L. Photonics, Planegg).

Bei der Durchführung der Messungen wurde mit den Exzitationswellenlängen λ_1 und λ_2 alle 0.2 sec ein Standbild aufgezeichnet. Auf einem dieser Bilder wurden einzelne Flächenelemente als „region of interest“ (ROI) markiert, in denen die mittlere Fluoreszenzintensität für jedes Standbild der aufgenommenen Sequenz errechnet wurde. Für jede ROI wurde der Quotient $R = F_1/F_2$ berechnet und über die Versuchszeit aufgetragen. Jede ROI wurde so gewählt, daß sie dem Soma und den proximalen Ausläufern der zu untersuchenden Zelle entsprach. Mit diesem Verfahren konnten mehrere Fura-2 AM geladene Zellen gleichzeitig in einem Experiment untersucht und anschließend einzeln ausgewertet werden.

3.5 Kalziummessung mit Oregon Green Bapta 1

Im Gegensatz zu Fura-2 handelt es sich bei Oregon Green Bapta 1 um einen nicht ratiometrischen, Einwellenlängen-Farbstoff. Um die Messung zu optimieren, wählt man eine Kombination von Exzitations- und Emissionswellenlängen, bei denen Änderungen der Kalziumkonzentration der Lösung zu maximalen Leuchtintensitätsänderungen führt. Der entscheidende Vorteil eines solchen Farbstoffes liegt in der Möglichkeit, ihn mit einer Laserwellenlänge des Edelgases Argon anzuregen. Dieser Farbstoff macht die Methode der ‘confocal laser scanning microscopy’ (CLSM) auf die Fragestellung der bildgebenden Kalziumkonzentrationsmessung an lebenden Organismen anwendbar. Die Nachteile eines solchen Farbstoffes liegen in der mangelnden Vergleichbarkeit von Messungen über einzelne Experimente hinweg, da die Fluoreszenzintensität nicht nur von der Kalziumkonzentration der Lösung abhängt, sondern auch von der Farbstoffkonzentration, der Anregungsintensität, der Bandbreite des Anregungslichtes, der Transmissivität der Optik, der Transmissivität der Emissionsfilter und der Empfindlichkeit der Lichtdetektoren. Man kann also nur relative Kalziumkonzentrationsänderungen messen, nicht aber die Kalziumkonzentrationen selbst. Außerdem werden solche Messungen durch

Konzentrationsänderungen des Farbstoffes, die auf Bleicheffekte oder Volumenänderungen der vermessenen Zelle zurückgehen, beeinflusst.

3.6 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Laser-scanning Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) ist eine mikroskopische Technik, die wesentliche Vorteile gegenüber der Epifluoreszenzmikroskopie bietet. Ein Laserstrahl wird durch ein Objektiv hoher numerischer Apertur fokussiert. Der Fokus des Lasers kann mit Hilfe beweglicher Teile der Optik zeilenweise über den untersuchten Ausschnitt des beobachteten Objektes geführt werden. Ein Photomultiplier (Verstärkerelektronik) setzt die Fluoreszenzintensität in ein elektrisches Signal um. Ein Computer kombiniert die Information über die Position des Laserfokus und die Fluoreszenzintensität zu einem Bild.

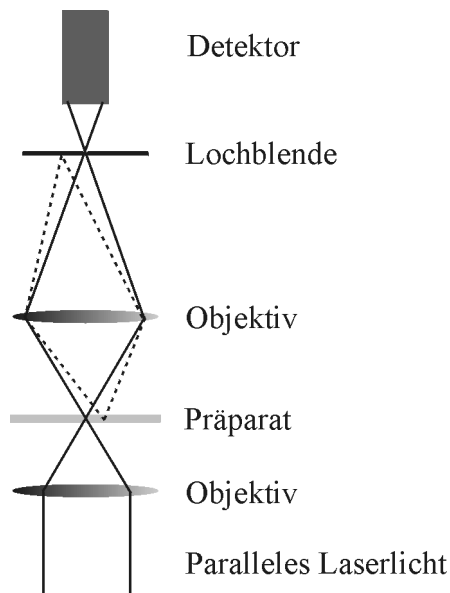


Abbildung 4: Schema zur Funktion der konfokalen Mikroskopie. Durch eine Lochblende wird Störlicht ausgeblendet.

Die Methode erhöht die axiale und die laterale Schärfe, indem sie Streulicht aus Objektebenen reduziert, die nicht beobachtet werden sollen. Das geschieht einerseits durch eine besser lokalisierte Anregung der Fluoreszenz mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls und andererseits durch das Ausblenden des Streulichts mit Hilfe einer Lochblende. Die Nachteile dieser Methode liegen zum einen in der eingeschränkten Wahl der Farbstoffe und zum anderen in dem relativ hohen Verlust von Fluoreszenzintensität an der Lochblende. Insbesondere ist der schnelle Wechsel

zweier Anregungswellen wie beim Monochromator technisch nicht realisiert, so daß nur Einwellenlängen-Farbstoffe in Frage kommen (z.B. Fluo 3 oder Oregon Green Bapta 1). Diese Einschränkung ist besonders kritisch, da bei diesen Farbstoffen, anders als bei Zweiwellenlängen-Farbstoffen wie z.B. Fura 2, nicht um den Bleicheffekt während der Messung korrigiert werden kann und da auf Grund des Lichtverlustes an der Lochblende eine vergleichsweise hohe Lichtintensität bei der Anregung benötigt wird. Ein weiteres Problem ergibt sich bei hohen Bildraten. Auf Grund des sequenziellen Abtastverfahrens ist die Gleichzeitigkeit der Bildpunkte nur bedingt gegeben. So kann z.B. der letzte aufgenommene Bildpunkt eines Bildes zeitlich näher am ersten aufgenommen Bildpunkt des folgenden Bildes liegen als am ersten Bildpunkt desselben Bildes.

In dieser Arbeit ist das CLSM Odyssey XL der Firma Noran Instruments verwendet worden. Dieses Gerät erreicht durch eine akustooptische Ablenkungseinheit für die Steuerung der Laserposition eine Bildrate von 25 Bildern/s (Videorate). Geringere Bildraten wurden über die Mittelung aufeinanderfolgender Bilder erreicht. Zur Steuerung des Systems und zur Auswertung der Daten wurde eine IRIS Indigo von SGI eingesetzt. Zur Archivierung wurden die Daten auf CD gebrannt. Das Odyssey ist an ein Mikroskop der Marke Axioskop von Zeiss gekoppelt. Zur Fokussierung des Lasers bzw. zum Sammeln des emittierten Lichtes hat sich das Objektiv LumPlanFL 40x 0.80w von Olympus bewährt. Ausschlaggebend ist, daß kein Phasenring Lichtenergie absorbiert. Das System wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch der Firma Newport montiert.

3.7 Die Patch-Clamp Methode

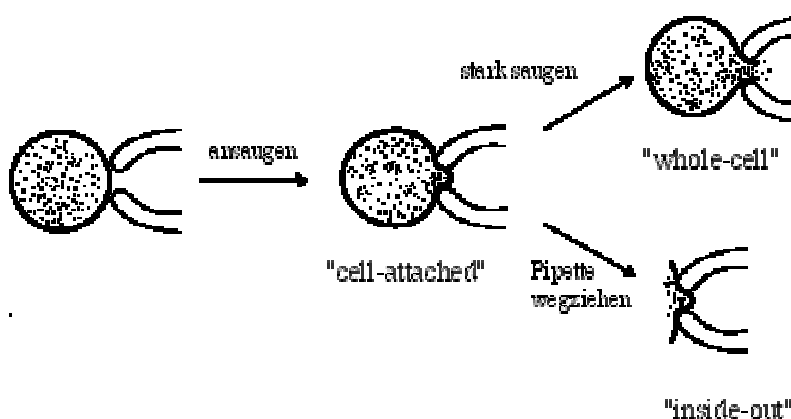
Patch-Clamp Messungen in der Ganzzellkonfiguration machen es möglich, das Expressionsmuster von Ionenkanälen und Rezeptoren von einzelnen Zellen in kurzer Zeit zu analysieren (Hamill, O. P. und Sakmann, B., 1981). Außerdem ist es möglich, die Zelle mit einer gegebenen Lösung zu dialysieren. Auf diese Weise läßt sich die Zelle mit einem Kalziumindikator wie z.B. Oregon Green Bapta 1 befüllen und es können die Kalziumkonzentrationsänderungen einer einzelnen Zelle mit ihrem Strommuster verglichen werden.

Die feinen Glaspipetten wurden mit dem horizontalen Pipettenziehgerät P-87 der Firma Shutter Instruments aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld) mit einem

Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0.87 mm hergestellt. Die Parameter des Pipettenziehgerätes wurden so gewählt, daß der elektrische Widerstand der Pipetten ca. 6 MOhm betrug. Die Pipetten wurden mit einer dem intrazellulären Ionenniveau entsprechenden Pipettenlösung befüllt. Ein Filament auf der Innenseite der Kapillaren erleichterte das Befüllen.

Die Pipetten wurden auf einen Pipettenhalter gesteckt, so daß eine Ag/AgCl Elektrode (im folgenden Meßelektrode) in die Pipettenlösung eintaucht. Die Elektrode ist an einen Patch-Clamp-Verstärker EPC9 der Firma HEKA angeschlossen. Als Referenz dient eine weitere Ag/AgCl Elektrode, die in die Badlösung eintaucht (alle Angaben im folgenden verstehen sich in Bezug zu dieser Referenzelektrode).

Mit einem hydraulischem Mikromanipulator der Firma Narishige wird die Pipettenöffnung unter Mikroskopkontrolle auf der Zellmembran plaziert. Durch leichten Unterdruck in der Pipette legt sich die Zellmembran fest auf die Ränder der Pipettenöffnung, bis sich eine stabile Glas-Membranverbindung mit einem elektrischen Widerstand von 2-3 GOhm ergibt. Anschließend starker Unterdruck zerstört die Membran zwischen Pipette und Zytosol, so daß ein leitender Zugang zum Zellinneren entsteht. Durch schnellen Abgleich des Stromflusses von der Meßelektrode zur Referenzelektrode wird durch den Patch-Clamp-Verstärker eine gegebene Spannung über der Zellmembran eingestellt (Spannungsklemme) und die auftretenden Membranströme gemessen und aufgezeichnet.



Zur Steuerung des Verstärkers wird das Programm TIDA für Windows 4.11 eingesetzt, das im Labor entwickelt worden ist. Dieses Programm ermöglicht über seine flexible Makrosprache äußerst komplexe Spannungsprotokolle. Die Daten

können mit Analysealgorithmen interaktiv ausgewertet werden. Die Eingabe von Stichwörtern erleichtert die Verwaltung der Daten.

3.8 Analyse von Kalziumantworten in Zellausläufern

Für diese Arbeit wurde eine besondere Auswertung für die gleichzeitige Darstellung der räumlichen, wie der zeitlichen Komponenten der Reaktion in Zellausläufern entwickelt. Das Ziel der Darstellung ist, eine etwaige Ausbreitung des Signals mit der Zeit im Raum, wie es im Falle einer Kalziumwelle der Falle wäre, geeignet zu visualisieren.

Das Verfahren wurde auf Daten des konfokalen Mikroskopsystems Odyssey XL angewendet. Aus der mitgelieferten Software wurden die Bilddaten im Tiff-Format exportiert. Diese Daten konnten in das frei verfügbare Bilddatenanalyseprogramm „Scion Image for Windows NT Beta 3b“ importiert werden. Mit dem „segmented line selection tool“ wurde der Ausläufer manuell nachgezeichnet. Die Funktion „Plot Profile“ gibt die Fluoreszenzintensitätswerte entlang des nachgezeichneten Ausläufers wider. Mit Hilfe eines für diese Arbeit entwickelten Makros konnte die Funktion automatisch auf alle Bilder des Datensatzes angewendet werden. Das Makro erzeugt eine Textdatei, in dem eine Zeile dem Fluoreszenzintensitätsverlauf des Ausläufers in einem Bild des Datensatzes entspricht. Diese Textdatei wurde in Microsoft Excel 97 importiert und dort mit weiteren Makros nachbearbeitet. Zuerst wird ein Medianfilter auf die Daten angewendet, anschließend wird das Mittel über zwei räumliche Nachbar-Datenpunkte und deren zeitliche Nachfolger gebildet. Aus der auf ein Viertel reduzierten Datenmenge werden die F/F_0 -Werte berechnet (s. oben). Diese werden mit der „Surface-Plot“-Funktion graphisch dargestellt. Die auf diese Weise erhaltene Graphik wird in das Zeichenprogramm Photoshop 4.0 kopiert und für den Ausdruck aufgearbeitet.

3.9 Statistische Auswertung der Kalziumantworten in Bergmann Gliazellsomata

Die Definition der „region of interest“ erfolgte vor dem Experiment mit Hilfe von Infarotaufnahmen und Fluoreszenzbildern des Schnittes. Dabei wurden die Somata eindeutig identifizierter Bergmann Gliazellen umkreist. Nachdem die Bilddaten im Experiment gewonnen waren, bot das Programm Vision 2.06 (T.I.L.L. Photonics,

Planegg) die Möglichkeit, Textdateien mit den Verläufen der Kalziumkonzentrationen auf den definierten „region of interest“ zu speichern. Die Textdateien wurden in das Programm „TIDA für Windows 4.11“ importiert. Dort war es mit Hilfe der „Cursor“-Funktion möglich, die Signalamplitude interaktiv zu bestimmen. Diese Daten wurden in Microsoft Excel 97 Tabellen gesammelt. Signalamplituden wurden für die Darstellung in Diagrammen ins Verhältnis zur Signalamplitude bei der ersten Antwort der Zelle auf elektrische Stimulation gesetzt. Zellen, die auf die erste Stimulation nicht reagiert haben, wurden an dieser Stelle diskriminiert. Aus den so berechneten Verhältnissen wird das arithmetische Mittel gebildet und „standard error of mean“ berechnet. Für die Berechnung der statistischen Tests wurden die gemessenen Signalamplituden in das Programm SigmaStat 2.03 von SPSS überführt. Der Test wurde nach der Standardeinstellung des Programms durchgeführt. Lagen die zu testenden Daten paarweise vor und gelang ein Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung der Daten, dann wurde ein gepaarter t-Test verwendet. Gelang der Tests auf Normalverteilung nicht, wurde der Wilcoxon-Test gerechnet. Lagen die Daten nicht paarweise vor, wurde der Mann-Whitney-Test gewählt. Als Signifikanzniveau wurde gemäß den Vorgaben des Programms eine Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5 % gewählt.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die elektrische Stimulation der Parallelfasern über die Ausschüttung von Neurotransmittern zu Kalziumsignalen in Bergmann Gliazellen führt. Eine Kombination zweier Techniken zur Messung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen eröffnet einen Vergleich zwischen somatischen Reaktionen und solchen im Ausläufer der Zelle. Mit Hilfe pharmakologischer Untersuchungen wurde versucht, die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. Dazu wurde die Beteiligung intrazellulärer Kalziumquellen und verschiedener Neurotransmitter untersucht.

4.1 Identifizierung der Bergmann Gliazellen im Kleinhirnschnitt

Die Bergmann Gliazellen wurden im frontalen Schnitt des Kleinhirns nach morphologischen Kriterien identifiziert. Die Somata der Bergmann Gliazellen liegen in der Purkinjezellschicht, die sich durch die überdurchschnittlich großen Somata (40-50 μ M) der Purkinjeneurone sehr leicht finden läßt. Von den Purkinjeneuronen lassen sie sich eindeutig an Hand ihrer sehr viel kleineren (10-15 μ M) Somata unterscheiden. Um eine Verwechslung mit den Körnerzellen auszuschließen, wurden nur Zellen in die Auswertung aufgenommen, deren Somata eindeutig zwischen Purkinjeneuronen oder auf der der Molekularschicht zugewandten Seite der Purkinjezellschicht liegen. Desweiteren wurde die charakteristische, langgestreckte, oft birnenförmig in mehrere Ausläufer mündende Form der Bergmann Gliazellen zur Hilfe genommen. Diese Form hebt sich deutlich von der runden Morphologie der Körnerzellen ab.

Zur Identifizierung der Zellen, die über eine Patch-Pipette mit einem Kalziumindikator beladen werden, wurden zusätzlich elektrophysiologische Kriterien zur Hilfe genommen. Das Ruhepotential der Bergmann Gliazellen liegt zwischen -66 und -75mV (Tuschick, S., 1997). Ausgehend von einem Haltepotential von -70mV wurde die Membran auf Spannungen im Bereich von -160mV bis +120mV im Abstand von 10mV geklemmt. Im Falle der Bergmann Gliazellen treten bei diesem Protokoll nur Stromänderungen auf, die auf passive Ionenkanäle zurückgehen. Im Unterschied zu Neuronen treten keine spannungsaktivierbaren Ionenkanäle auf.

4.2 Kalziumsignale in Bergmann Gliazellsomata als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern

4.2.1 Messung der Kalziumsignale

Für Messungen an den Zellsomata wurden ausschließlich im „bulk-loading“-Verfahren (s. Material und Methoden 3.4.1) geladene Schnitte verwendet. Die Identifizierung erfolgte nach morphologischen Kriterien. Zur Analyse der Zellausläufer wurden die Zellen über eine Patch-Clamp-Pipette mit einem Kalziumindikator dialysiert (s. Material und Methoden 3.6).

Um Neuron-Glia Interaktionen mit Hilfe von Kalziumsignalen in den Bergmann Gliazellsomata nachzuweisen, wurde die neuronale Verschaltung des cerebellaren Cortex ausgenutzt. Die Neurone der Körnerzellschicht senden ihre Axone in die Molekularschicht, in der sie sich T-förmig aufspalten, um dann parallel zur Purkinjzellschicht zu verlaufen. Die Axone terminieren auf den dendritischen Spines der Purkinjeneurone. Die Bergmann Gliazellen umschließen diese Synapsen mit ihren Ausläufern.

Zur elektrischen Stimulation wurde eine Stimulationselektrode (s. Material und Methoden 3.6) im Abstand von ca. 200 μ M vom beobachteten Ausschnitt etwa in der Mitte der Molekularschicht plaziert. An die Elektrode wurde zehn Mal im Abstand 20 ms (50 Hz) für jeweils 200 μ s eine Spannung von erst +50 V und dann -50 V angelegt. Unter diesen Umständen ließ sich in ca. 20% der Versuche ein Kalziumsignal in den beobachteten Bergmann Gliazellsomata auslösen (Abb. 5).

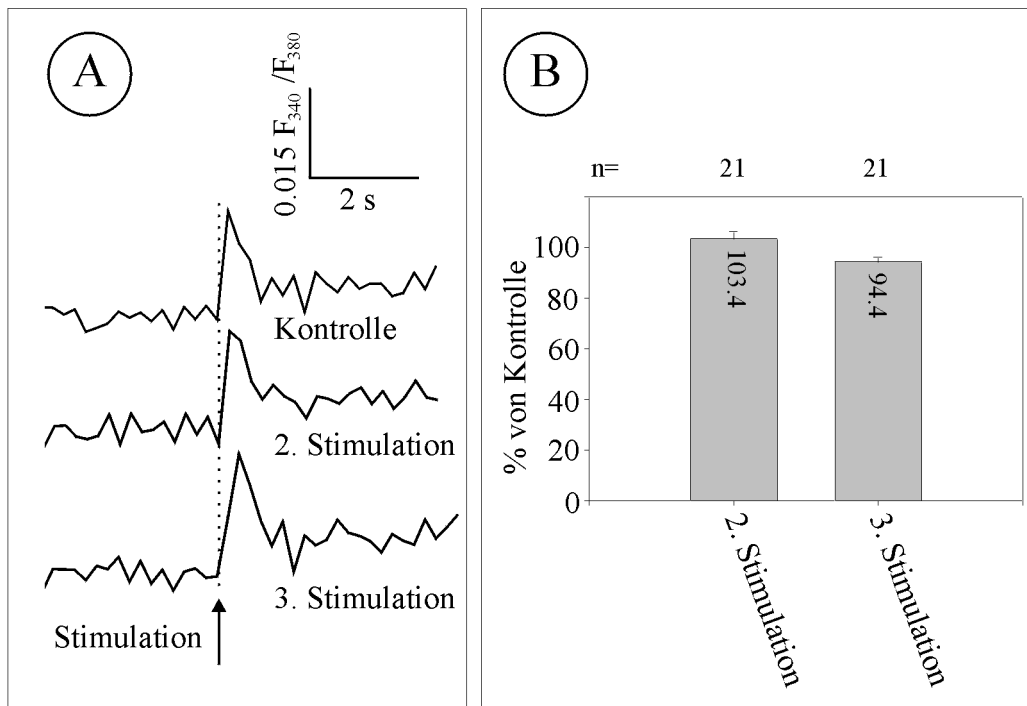


Abbildung 5: Kalziumantworten von Bergmann Gliazellen auf drei aufeinanderfolgende elektrische Stimulationen zu je zehn biphasischen Spannungspulsen a ± 50 V für jeweils $200 \mu\text{s}$ im Abstand von 20 ms (50 Hz). A) Dargestellt ist die repräsentative Reaktion einer Bergmann Gliazelle. Eine Veränderung der Form oder Amplitude des Signals ist nicht zu erkennen. Die Spuren zeigen eine Änderung des Fluoreszenzintensitätsverhältnisses bei den Anregungswellenlängen 340 nm zu 380 nm. Dieser Wert ist proportional zur intrazellulären Konzentration freier Kalziumionen. Der Pfeil markiert den Moment der Stimulation. Die Abtastrate betrug in diesem Experiment 3 Bilder pro Sekunde. B) Das Diagramm zeigt die statistische Auswertung von 21 Bergmann Gliazellen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel der Verhältnisse der maximalen Amplituden der zweiten und dritten Reaktion im Verhältnis zum entsprechenden Wert der ersten Reaktion der untersuchten Zellen. Eine statistisch signifikante Änderung (gepaarter t-Test) der Amplitude in Laufe der drei Stimulationen ist nicht zu erkennen (* markiert signifikante Unterschiede).

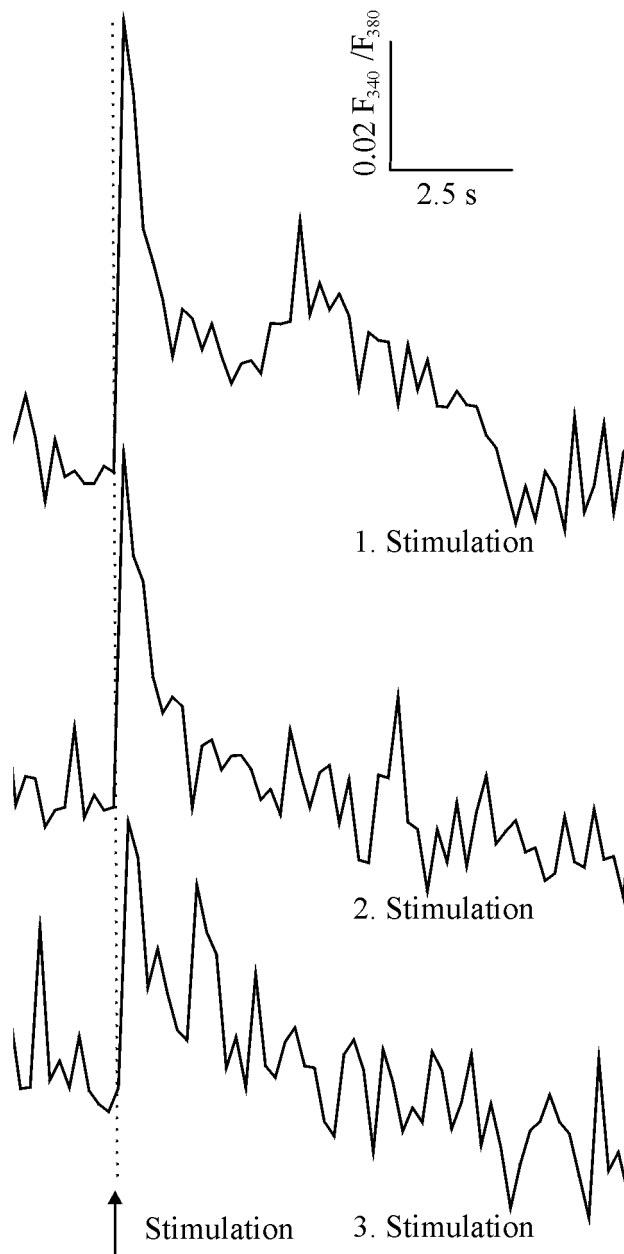


Abbildung 6: Biphasische Reaktion einer Bergmann Gliazelle auf elektrische Stimulation der Parallelfasern. In der ersten Stimulation folgt der initialen Spitze ein länger (ca. 6 sec) andauerndes Plateau. Das Plateau ist in der zweiten und dritten Stimulation nicht mehr zu beobachten.

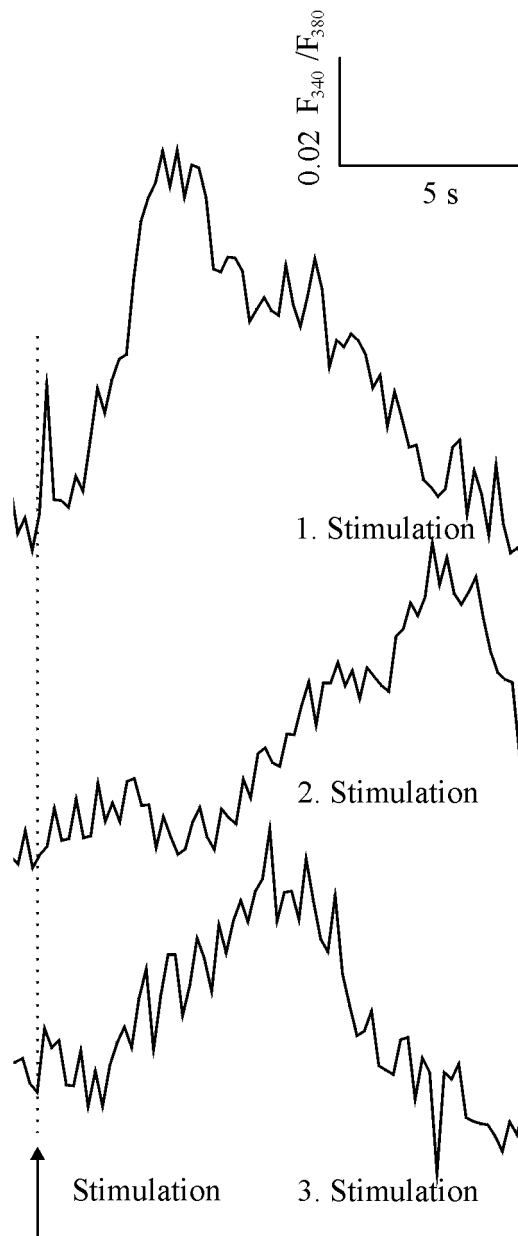


Abbildung 7: Kalziumreaktion einer Bergmann Gliazelle auf drei aufeinanderfolgende Stimulationen mit jeweils 100 Pulsen. Eine schnelle initiale Spitze geht in eine lang andauernde, relativ langsam ansteigende Reaktion über. Im Laufe zweier weiterer Stimulationen zeigt sich, daß die zweite Phase der Antwort in Form, Dauer und Zeitpunkt des Beginns nicht stabil bleibt.

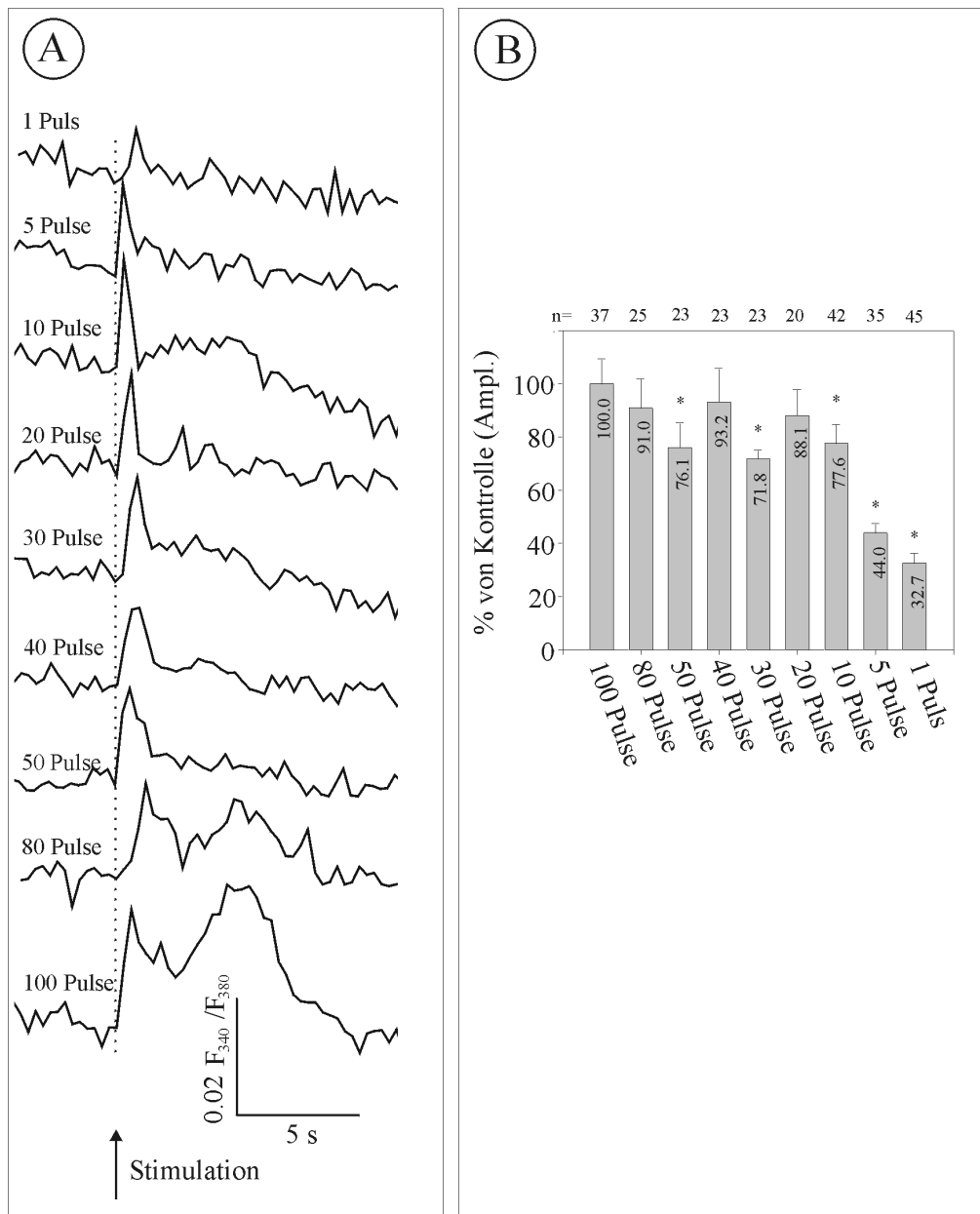


Abbildung 8: Kalziumantwort einer Bergmann Gliazelle auf verschiedene Anzahlen von Pulsen in der elektrischen Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die repräsentative Antwort einer Zelle. Die initiale Spitze bleibt in allen Reaktionen deutlich vorhanden. Bei mehr als 80 Pulsen tritt eine zweite, langanhaltende Plateauphase auf. B) Bezugspunkt der dargestellten Prozente ist die mittlere, maximale Signalamplitude bei 100 Pulsen. Die mittlere Signalamplitude steigt im Schritt von 5 zu 10 Pulsen auf nahe zu das Doppelte an. Bei einer weiteren Steigerung der Pulszahlen erhöht sich die maximale Signalamplitude nur noch unwesentlich. Bei Stimulationen mit mehr als 20 Pulsen ergibt der Mann-Whitney-Test nur noch teilweise einen signifikanten Unterschied zu dem Bezugspunkt.

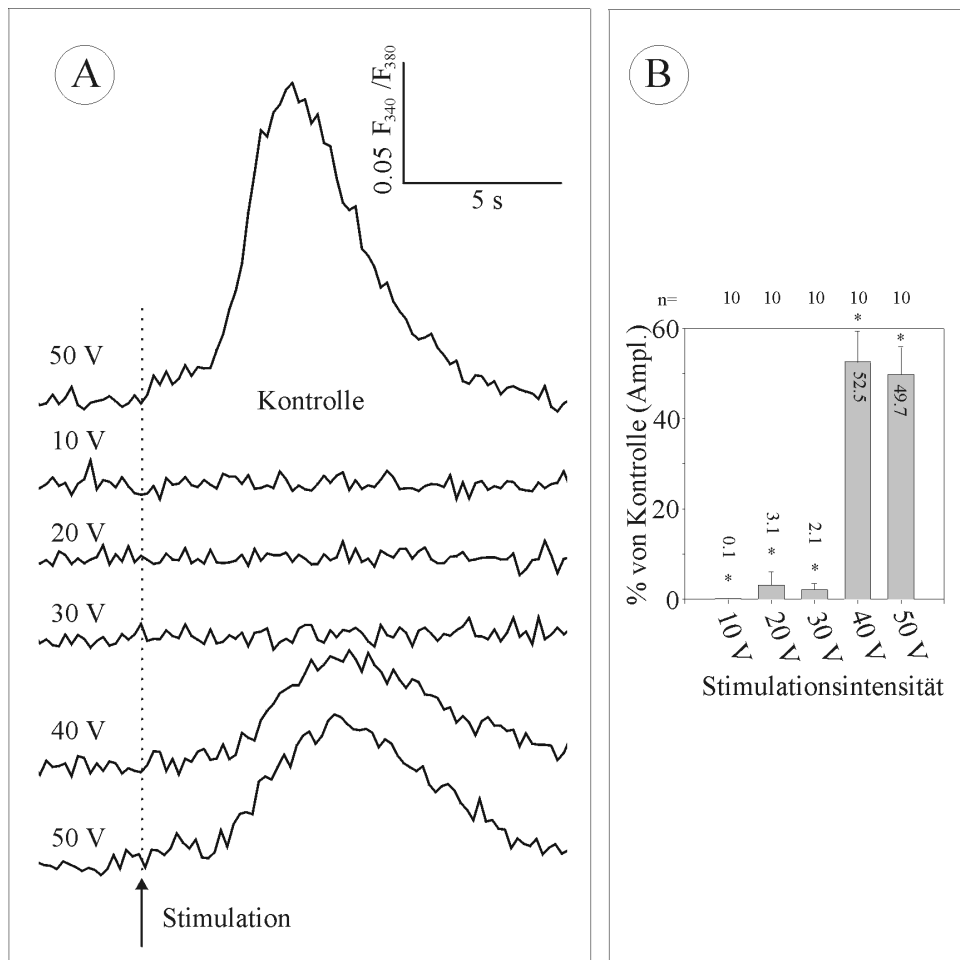


Abbildung 9: Kalziumantwort einer Bergmann Gliazelle auf elektrische Stimulation mit 80 Pulsen bei verschiedenen Spannungen. A) Die Zelle wird mit 80 Pulsen bei verschiedenen Spannungen zuerst mit ± 50 V, dann mit ± 10 V, ± 20 V, ± 30 V, ± 40 V und zuletzt wieder mit ± 50 V stimuliert. Die Kalziumspuren zeigen keine Reaktion auf Stimulationen mit ± 10 V - ± 30 V. Auf Stimulationen mit mehr als ± 40 V reagiert die Zelle deutlich. B) In dem Diagramm ist das Verhältnis der Antworten auf die verschiedenen Stimulationen zu der Antwort auf die erste Stimulation mit ± 50 V dargestellt. Die Zellen antworten erst auf Stimulationsspannungen von mindestens ± 40 V. Der gepaarte t-Test zeigt eine signifikante Abnahme ($n=10$) der Reaktionsamplituden der späteren Versuche im Vergleich zu der ersten Stimulation, auch wenn mit der gleichen Spannung stimuliert wird. Dieser Effekt tritt bei 80 Pulsen, nicht aber bei 10 Pulsen auf.

4.2.2 Wahl optimaler Stimulationsparameter

Zur Bestimmung optimaler Parameter für die weiteren Untersuchungen wurden die Anzahl der Pulse, die Frequenz und die Stimulationsspannung der Pulsgaben variiert.

Es hat sich gezeigt, daß mindestens zehn Pulse notwendig sind, um ein zuverlässig meßbares Kalziumsignal im Zellsoma hervorzurufen. Bei den Versuchen konnten bis zu zwei verschiedene Phasen beobachtet werden.

Ein kurzes (1-2 sec) initiales Kalziumsignal (im weiteren: Reaktion bzw. Signal) tritt zuverlässig und häufig wiederholbar auf. Die Auswertung der beobachteten Reaktionen beruht auf den gemessenen maximalen Reaktionsamplituden. Das Vorhandensein und die deutliche Ausprägung (Maximum der Reaktion – Ruhelevel $> 0.01[F_{340}/F_{380}]$) des kurzen, initialen Kalziumsignals in der ersten Stimulation dient im folgenden als Einschlußkriterium für die statistische Auswertung einer Zelle. Das in Abb. 5 dargestellte Experiment wiederholt die Gabe von zehn biphasischen Spannungspulsen dreimal. Der gepaarte t-Test ($n=21$) erkennt keine signifikante Abschwächung der maximalen Reaktionsamplituden in der zweiten und dritten gegenüber der ersten Stimulation. Im Mittel fällt die zweite Reaktion um 3.4 % höher und die dritte um 5.6 % niedriger aus als die Reaktion auf die erste Stimulation (gemessen als Verhältnis zur Reaktionsamplitude bei der ersten Stimulation).

In zahlreichen Beispielen folgt dem ersten Signal eine zweite langsamere (5-10 sec) Phase (Abb. 6). In der zweiten oder dritten Wiederholung der Stimulation ist die zweite Phase nicht mehr nachweisbar. Steigert man die Zahl der Pulse auf 20 bis 100 Pulse, so tritt die zweite Phase häufiger auf, klingt aber ebenfalls ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit im Laufe weniger Wiederholungen ab (Abb. 7 zeigt ein Beispiel für 100 Pulse). Je mehr Pulse man zur Stimulation verwendet, desto wahrscheinlicher ist, daß die initiale schnelle Antwort nicht mehr erkennbar ist und als Teil in der langsamen Phase aufgeht (Abb. 8).

Mit Hilfe eines Experiments, in dem die Anzahl der Pulse zwischen 1-100 Pulsen (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100 Pulse) variiert wurde, konnten 10 Pulse als optimale Anzahl von Pulsen für pharmakologische Untersuchungen bestimmt werden. Die initiale Spitze läßt sich vor allem bei kleineren Pulsanzahlen gut vermessen. Bei mehr als 80 Pulsen tritt eine zweite, langanhaltende Plateauphase auf. Die mittlere Signalamplitude steigt im Schritt von 5 zu 10 Pulsen auf nahezu das Doppelte an. Bei einer weiteren Steigerung der Pulszahlen erhöht sich die maximale Signalamplitude nur noch unwesentlich. Im Vergleich der Stimulationen mit mehr als 20 Pulsen zu

den Stimulationen mit 100 Pulsen ergibt der Mann-Whitney-Test (n=45 für einen Puls; n=35 für 5 Pulse; n=42 für 10 Pulse; n=20 für 20 Pulse; n=23 für 30 Pulse; n=23 für 40 Pulse; n=23 für 50 Pulse; n=25 für 80 Pulse; n=37 für 100 Pulse) nur noch teilweise (50, 30 Pulse) einen signifikanten Unterschied.

In einem weiteren Versuch wurde die optimale Stimulationsspannung ermittelt. Nach einer Kontrollstimulation mit ± 50 V wurde die Stimulationsspannung von ± 10 V bis auf ± 50 V in ± 10 V Schritten erhöht. Abbildung 9 stellt das Ergebnis dar. Ein alles-oder-nichts-Effekt (Steigerung 2.1 % auf 52.5 % gemessen als Verhältnis zur ersten Stimulation) tritt bei dem Schritt von ± 30 V zu ± 40 V auf. In dem Schritt von ± 40 V zu ± 50 V zeigt sich ein leichter Abfall der mittleren Signalamplitude von 2.8 %. Der gepaarte t-Test zeigt eine signifikante Abnahme (n=10) der Reaktionsamplituden der späteren Versuche im Vergleich zu der ersten Stimulation, auch wenn mit der gleichen Spannung stimuliert wurde. Dieser Effekt tritt bei 80 Pulsen, nicht aber bei 10 Pulsen (s. oben) auf.

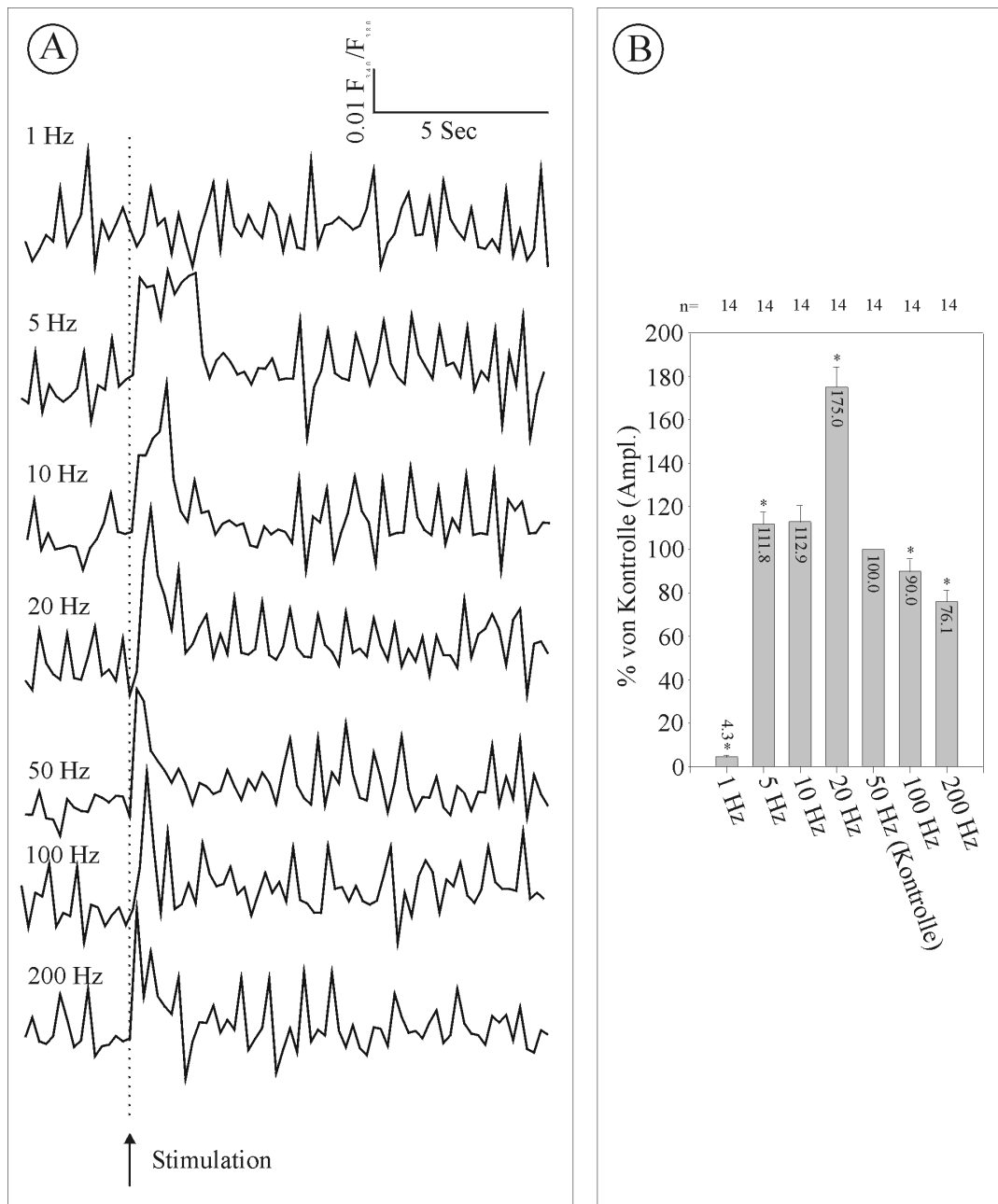


Abbildung 10: Kalziumantworten einer Bergmann Gliazelle bei elektrischer Stimulation mit 10 Pulsen bei verschiedenen Frequenzen. A) In den Kalziumspuren zeigt sich keine Antwort bei 1 Hz, aber schon bei 5 Hz ist mehr als die volle Amplitude der Bezugsmessung erreicht. Darüberhinaus zeigen die Spuren, daß ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Dauer der Stimulation und der zeitlichen Länge der Antwort besteht. Je länger stimuliert wird, desto länger fällt die Antwort aus. B) Die Verhältnisse beziehen sich auf die Messung mit 50 Hz Stimulationsfrequenz. Das Diagramm zeigt, daß der Bereich von 5 Hz bis 100 Hz maximale Reaktionsamplituden erreicht. Der gepaarte t-Test zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Bezugsmessung und allen weiteren Messungen außer der Stimulation mit 10 Hz. Auffällig ist ein Ausreißer bei einer Stimulationsfrequenz von 20 Hz, bei der die Signalamplitude fast verdoppelt ist.

In dieser Arbeit wurde 50 Hz als Stimulationsfrequenz gewählt, da diese Frequenz ein typischer Wert in der Literatur ist (Newman, E. A. und Zahs, K. R., 1998). Zusätzlich wurde der Signalverlauf der Kalziumantworten in Abhängigkeit von der

Stimulationsfrequenz untersucht (Abb. 10). Die Parallelfasern wurden mit 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 200 Hz stimuliert. Die maximalen Signalamplituden der Reaktionen wurden ins Verhältnis zu der Bezugsmessung mit einer Stimulationsfrequenz von 50 Hz gesetzt. Während bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz keine Antwort (4.3 %) zu erkennen ist, steigert sich die Reaktionsamplitude im Schritt auf eine Stimulationsfrequenz von 5 Hz auf 111.8 %. Die Signalamplituden im höheren Frequenzbereich nehmen unwesentlich ab (90 % bei 100 Hz; 76.1 % bei 200 Hz). Auffällig ist der Ausreißer bei 20 Hz (175.0 %). In den Kalziumspuren zeigt sich, daß die zeitliche Länge der Antwort bei niederfrequenten Stimulationen ansteigt. Zu berücksichtigen ist, daß die Dauer der Reizung bei niederfrequenten Stimulationen ebenfalls ansteigt.

4.2.3 Neuronale Aktivität ist notwendig für stimulationsvermittelte Kalziumantworten

Um methodische Probleme auszuschließen, wurden verschiedene Antagonisten für neuronale Übertragung appliziert. Sowohl mit Tetrodotoxin (TTX) als auch mit Kadmium und kalziumfreier Lösung konnte die beobachtete Antwort unterbunden werden. In allen Fällen konnte das Signal in nahezu seiner ursprünglichen Form wiederhergestellt werden, nachdem der Antagonist ausgewaschen war (Abb. 11).

4.2.4 TTX blockiert stimulationsvermittelte Kalziumantworten

In dieser Arbeit wurde Tetrodotoxin (TTX), ein Antagonist spannungsaktivierter Natriumkanäle, auf die Messung von Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern angewendet. Tetrodotoxin verhindert die Ausbreitung von Aktionspotentialen. In Gegenwart von Tetrodotoxin kann eine elektrische Stimulation der Fasern keine Reizleitung auslösen. Die Ausschüttung von Neurotransmittern an der Synapse unterbleibt. Ein Kalziumsignal, das auf synaptische Aktivität zurückgeht, wird unterbunden.

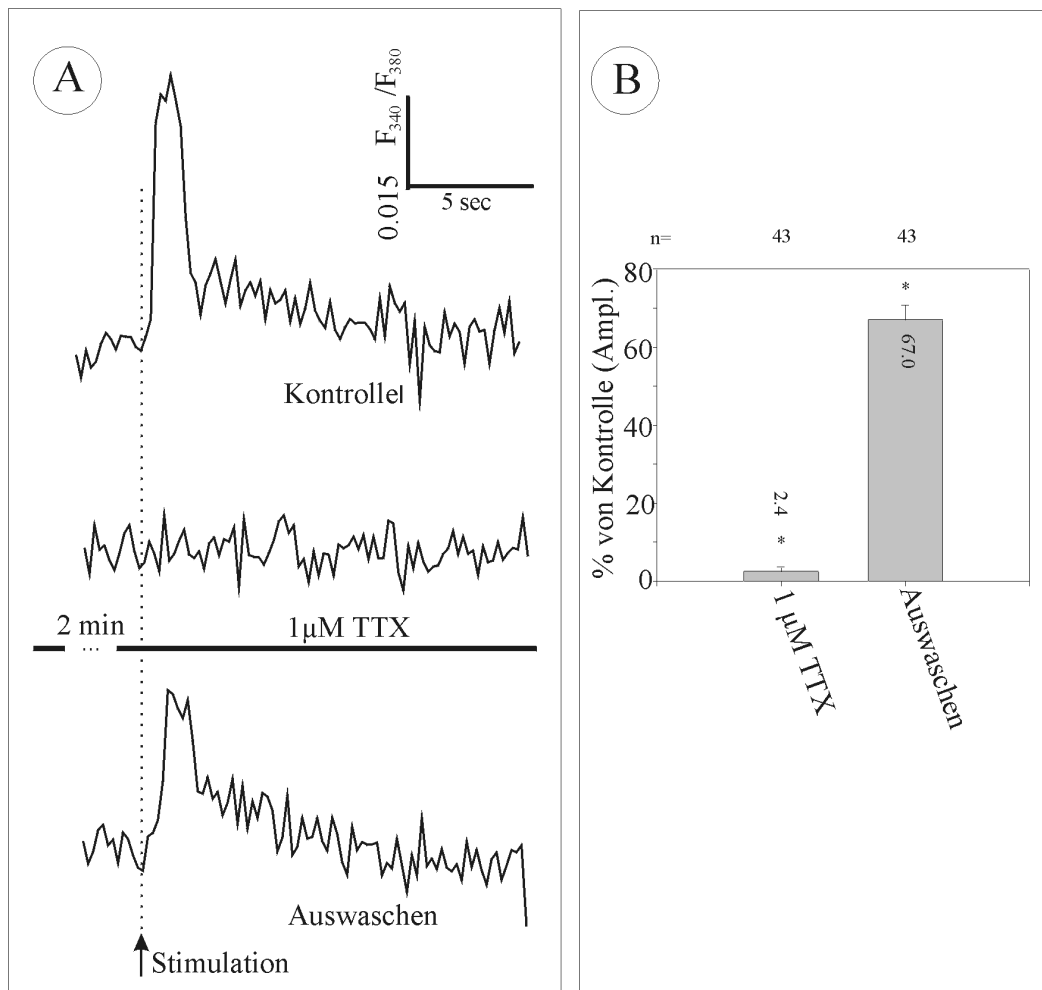


Abbildung 11: 1 µM TTX unterbindet somatische Kalziumantworten in der Bergmann Gliazelle als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern reversibel. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Gabe von 1 µM TTX. In Gegenwart von TTX ist keine Reaktion mehr zu erkennen. Die Pfeile zeigen den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Gabe von TTX. Die Reaktion ist in Gegenwart von TTX vollständig blockiert (2.4 %) und stellt sich nach dem Auswaschen des Blockers zu nur 67.0 % wieder her. Der gepaarte t-Test (n=43) ergibt, daß sowohl die Blockade des Signals als die Wiederherstellung signifikante Effekte sind.

Durch die Gabe von 1 µM TTX konnte in allen durchgeführten Experimenten die Auslösung von Kalziumsignalen durch Stimulation der Parallelfasern reversibel unterbunden werden. Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen dient, wurde 1 µM TTX eingewaschen. Die Stimulationen der Parallelfasern in Gegenwart des Antagonisten wurden 1-3 min nach dem Einwaschen durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen wurden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird in Abb. 11 gezeigt. Wie die statistische Auswertung in Abb. 11 B) zeigt, reduziert TTX die Reaktion im Mittel um 97.6 %. Nach dem

Auswaschen des Blockers stellen sich 67.0 % der ursprünglichen Reaktion wieder ein. Der gepaarte t-Test (n=43) zeigt, daß sowohl die Blockade gegenüber der Kontrollmessung als auch die Wiederherstellung des Signals nach dem Auswaschen von TTX gegenüber der Blockade signifikante Effekte sind. TTX ist sehr wirkungsvoll, um die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu blockieren.

4.2.5 Kalziumfreie Lösung blockiert stimulationsvermittelte Kalziumantworten

Die durch Aktionspotentiale hervorgerufene Depolarisierung der präsynaptischen Endigung führt zum Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration löst die Fusion der Synaptosomen mit der Plasmamembran und in Folge die Ausschüttung der gespeicherten Neurotransmitter in den synaptischen Spalt aus. In kalziumfreier Lösung ist dieser Mechanismus blockiert.

In den Bergmann Gliazellen konnten in kalziumfreier Badlösung nur deutlich reduzierte stimulationsvermittelte Kalziumantworten hervorgerufen werden. Dieser Effekt konnte durch das Einwaschen der normalen Badlösung rückgängig gemacht werden. Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen diente, wurde kalziumfreie Lösung eingewaschen. Die Stimulationen der Parallelfasern wurden 3 min nach dem Einwaschen der kalziumfreien Lösung durchgeführt. 10-20 min nach dem Auswaschen erfolgte eine weitere Kontrollstimulation. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird in Abb. 12 gezeigt. Die statistische Auswertung in Abb. 12 zeigt, daß kalziumfreie Lösung die Reaktion im Mittel um 70.2 % im Verhältnis zu Anfangsreaktion reduziert. Durch Einwaschen normaler Badlösung kann im Mittel 93.9 % der Kontrollreaktion wiederhergestellt werden. Der gepaarte t-Test (n=15) zeigt, daß sowohl die Blockade gegenüber der Kontrollmessung als auch die Wiederherstellung des Signals nach dem Einwaschen normaler Badlösung gegenüber der Blockade signifikante Effekte sind. Kalziumfreie Lösung ist sehr wirkungsvoll, um die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu blockieren.

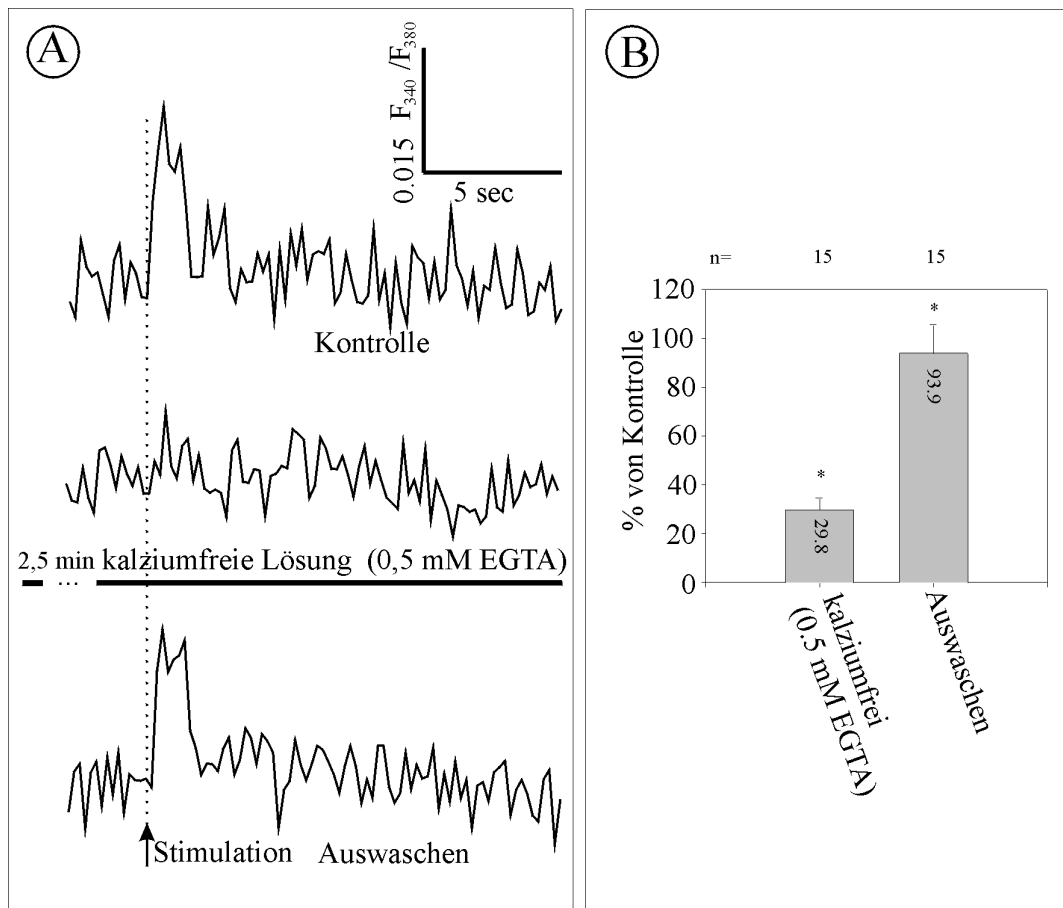


Abbildung 12: Kalziumfreie Lösung (0.5 mM EGTA) unterbindet somatische Kalziumantworten in der Bergmann Gliazelle als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern reversibel. A) Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation der kalziumfreien Lösung. In Gegenwart von kalziumfreier Lösung ist die Reaktion deutlich reduziert. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation von kalziumfreier Lösung. Die Reaktion ist in Gegenwart von kalziumfreier Lösung deutlich reduziert (29.8 %). Die Reaktion stellt sich nach dem Einwaschen der normalen Badlösung nahezu vollständig wieder ein (93.9 %). Der gepaarte t-Test (n=15) ergibt, daß sowohl die Blockade des Signal als die Wiederherstellung signifikante Effekte sind.

1.3.5 Cadmium blockiert stimulationsvermittelte Kalziumantworten

Wie oben beschrieben ist der Einstrom von extrazellulärem Kalzium durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle essentiell für die synaptische Aktivität. Cadmium blockiert die spannungsaktivierten Kalziumkanäle und unterbindet Neurotransmitterausschüttung.

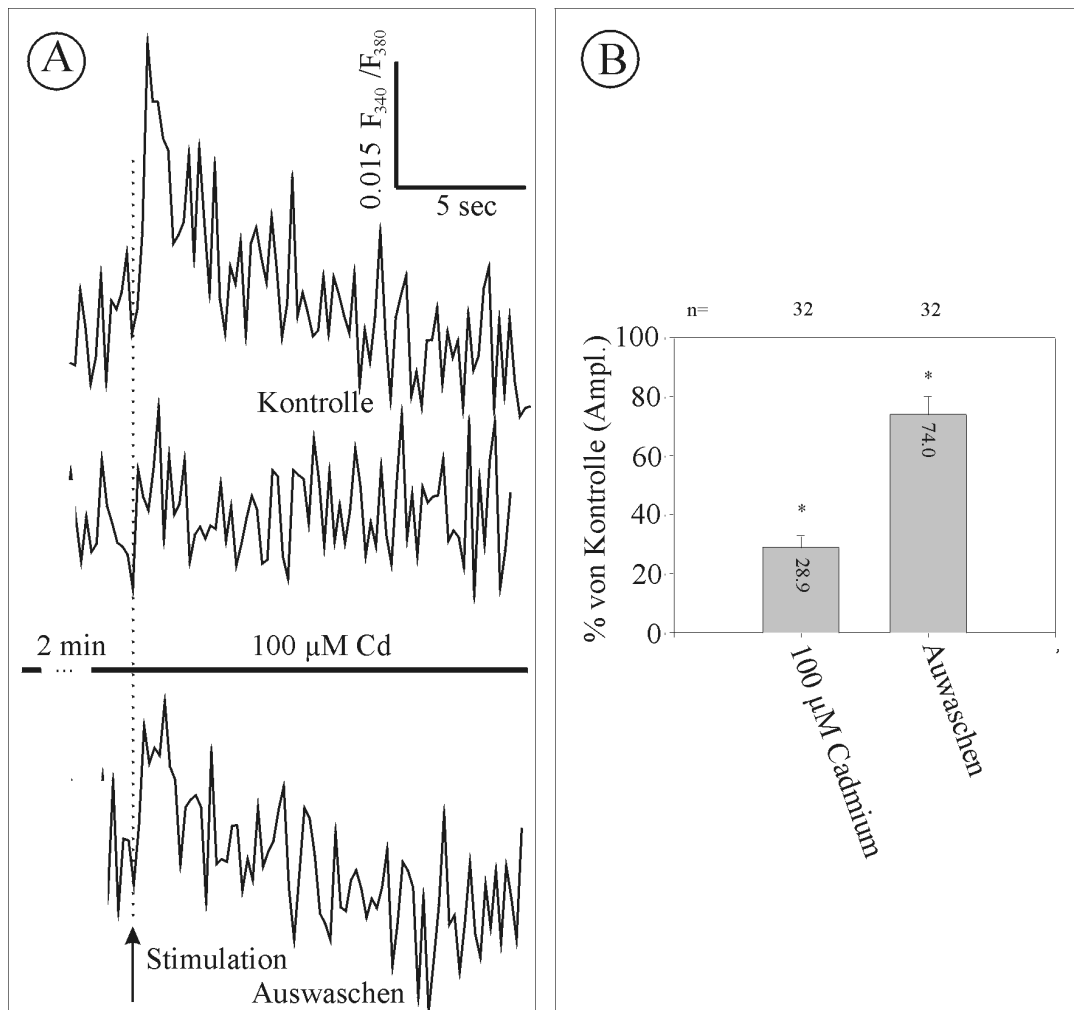


Abbildung 13: 100 μ M Cadmium unterbindet somatische Kalziumantworten in der Bergmann Gliazelle als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern reversibel. A) Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation von 100 μ M Cadmium. In Gegenwart von kalziumfreier Lösung ist die Reaktion deutlich reduziert. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die Reaktion ist in Gegenwart von 100 μ M Cadmium deutlich reduziert (28.9 %). Die Reaktion stellt sich nach dem Einwaschen der normalen Badlösung zum großen Teil wieder ein (74.0 %). Der gepaarte t-Test (n=32) ergibt, daß sowohl die Blockade des Signal als die Wiederherstellung signifikante Effekte sind.

In den durchgeführten Experimenten zeigt sich, daß Cadmium Kalziumantworten im Soma von Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern reversibel blockiert. Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen diente, wurde 100 μ M Cadmium eingewaschen. Stimulationen der Parallelfasern in Gegenwart des Antagonisten wurden 1-2 min nach dem Einwaschen des Antagonisten durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen

wurden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird in Abb. 12 gezeigt. Die statistische Auswertung in Abb. 12 zeigt, daß Kadmium die Reaktion im Mittel um 71.1 % im Verhältnis zu Anfangsreaktion reduziert. Durch Einwaschen normaler Badlösung kann im Mittel 74.0 % der Kontrollreaktion wiederhergestellt werden. Der gepaarte t-Test (n=32) zeigt, daß sowohl die Blockade gegenüber der Kontrollmessung als auch die Wiederherstellung des Signals nach dem Einwaschen normaler Badlösung gegenüber der Blockade signifikante Effekte sind. Cadmium ist sehr wirkungsvoll, um die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu reduzieren.

4.3 Die Rolle IP₃-vermittelter Kalziumreaktionen

Durch das folgende Experiment wurde die Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums als Kalziumquelle an dem zytosolischen Kalziumanstieg untersucht.

Zu Beginn wurde die Reaktion auf eine Stimulation gemessen. Das Ergebnis dient als Bezugspunkt für die nachfolgenden Messungen. Anschließend wurde die Sakro-Endoplasmatische-Retikulum-Kalzium-Pumpe (sacro endoplasmatic retikulum calcium pump, SERCA) durch zehnmünütige Gegenwart von 1 µM Thapsigargin blockiert. Das endoplasmatische Retikulum ist danach nicht mehr in der Lage seine Kalziumspeicher wieder aufzufüllen. Allerdings muß nach Deaktivierung von SERCA sichergestellt werden, daß kein Kalzium mehr in dem endoplasmatischen Retikulum gespeichert ist. Die wiederholte Aktivierung von IP₃-Rezeptoren führt zum Entleeren der Speicher. Als Agonist für den IP₃-Weg bietet sich Adenosin-tri-Phosphat (ATP) an. Aus der Arbeit von S. Kirischuk (Kirischuk, et al., 1995) ist bekannt, daß die wiederholte Applikation von 100 µM ATP zuverlässig zur Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum über den IP₃-Weg und so zur Entleerung der Thapsigargin sensitiven intrazellulären Kalziumspeicher führt. Nach Applikation von Thapsigargin führt die fünfte bis achte Applikation zu keinem meßbaren Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (Abb. 14). Ist dieser Zustand erreicht, so kann man davon ausgehen, daß Thapsigargin sensitive intrazelluläre Kalziumspeicher nicht an der Generierung weiterer Kalziumsignale beteiligt sind.

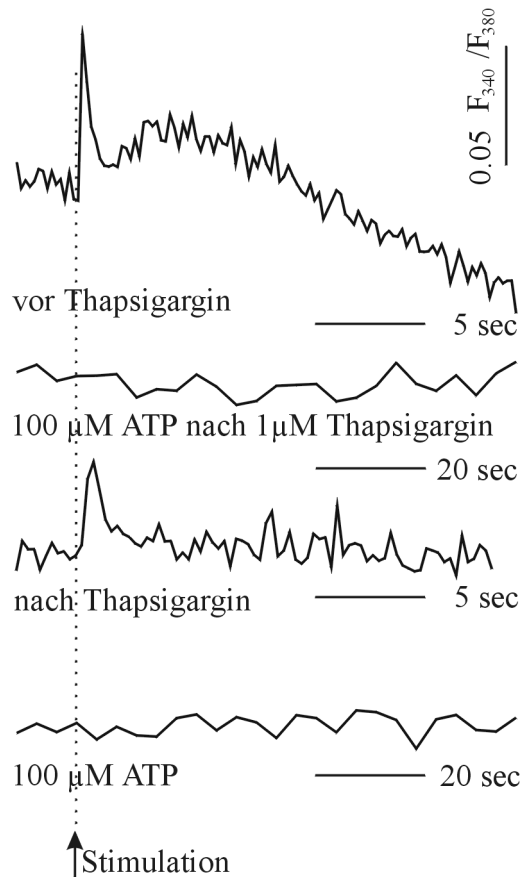


Abbildung 14: Kalziumantwort in einem Bergmann Gliazellsoma als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern mit entleertem endoplasmatischem Retikulum. Die Abbildung zeigt: 1. Reaktion der Zelle vor Entleerung der Speicher und Applikation von $1\mu\text{M}$ Thapsigargin 2. Zelle reagiert nicht mehr auf $100\mu\text{M}$ ATP nach Inkubation mit $1\mu\text{M}$ Thapsigargin und mehreren Applikationen von $100\mu\text{M}$ ATP 3. Die Zelle reagiert unvermindert auf elektrische Stimulation 4. Abschließende Applikation von ATP, keine Reaktion, die Speicher sind leer.

In Abbildung 14 wird ein typisches Experiment gezeigt. Die letzte Applikation von $100\mu\text{M}$ ATP führt zu keiner meßbaren Antwort mehr. Die Auswertung in Abbildung 14 B), zeigt, daß Reaktion auf elektrische Stimulation unvermindert ist (94.0 % der Kontrolle). Der Mann-Whitney-Test findet keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollstimulation ($n=43$) und der Stimulation mit entleerten Kalziumspeichern des endoplasmatischen Retikulums ($n=29$). Eine abermalige Applikation von $100\mu\text{M}$ ATP bewirkt keine Kalziumantwort in der Bergmann Gliazelle. Man kann schlußfolgern, daß sich die intrazellulären Speicher in der Zwischenzeit nicht wieder durch eine Thapsigargin insensitive Form einer Kalziumpumpe aufgeladen haben. Eine Beteiligung des endoplasmatische Retikulums an Kalziumantworten in Bergmann Gliazellsomata auf elektrische Stimulation kann nicht nachgewiesen werden.

4.4 Wirkung spezifischer Neurotransmitter Antagonisten

Neben einem systematischen Ansatz, die Quelle der Kalziumsignale einzukreisen, wurde versucht, durch spezifische Antagonisten für die bekannten, Kalzium induzierenden Neurotransmitter den vermittelnden Mechanismus zu identifizieren. Bei der Auswahl der Antagonisten boten die Vorarbeiten aus der Dissertation von Sebastian Tuschik (Tuschik, S., 1997) eine Stütze. Im folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Neurotransmitter und die Wirkung ihrer Antagonisten auf stimulationsbedingte Kalziumsignale beschrieben.

1.5.1 Adrenalin und Noradrenalin

Wie in der Arbeit von Kirischuk und Tuschik (Kirischuk, et al., 1996) gezeigt, sind die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin in der Lage, Kalziumsignale auf Bergmann Gliazellen auszulösen. Mit Hilfe spezifischer Agonisten und Antagonisten konnte gezeigt werden, daß Bergmann Gliazellen über $\alpha 1$ -adrenerge Rezeptoren verfügen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt über den PLC-IP₃ Weg eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Signale sind Thapsigargin sensitiv, so daß man auf die Kalziumspeicher im endoplasmatischen Retikulum als Ursprung des Signals schließen kann. Um die Beteiligung $\alpha 1$ -adrenerger Rezeptoren an Kalziumantworten auf elektrische Stimulation zu untersuchen, sind zwei Ansätze verwendet worden. Zum einen ist die Wirksamkeit des $\alpha 1$ -Antagonisten Prazosin untersucht worden und zum anderen kann das Ergebnis des Versuchs in Gegenwart von Thapsigargin verwendet werden.

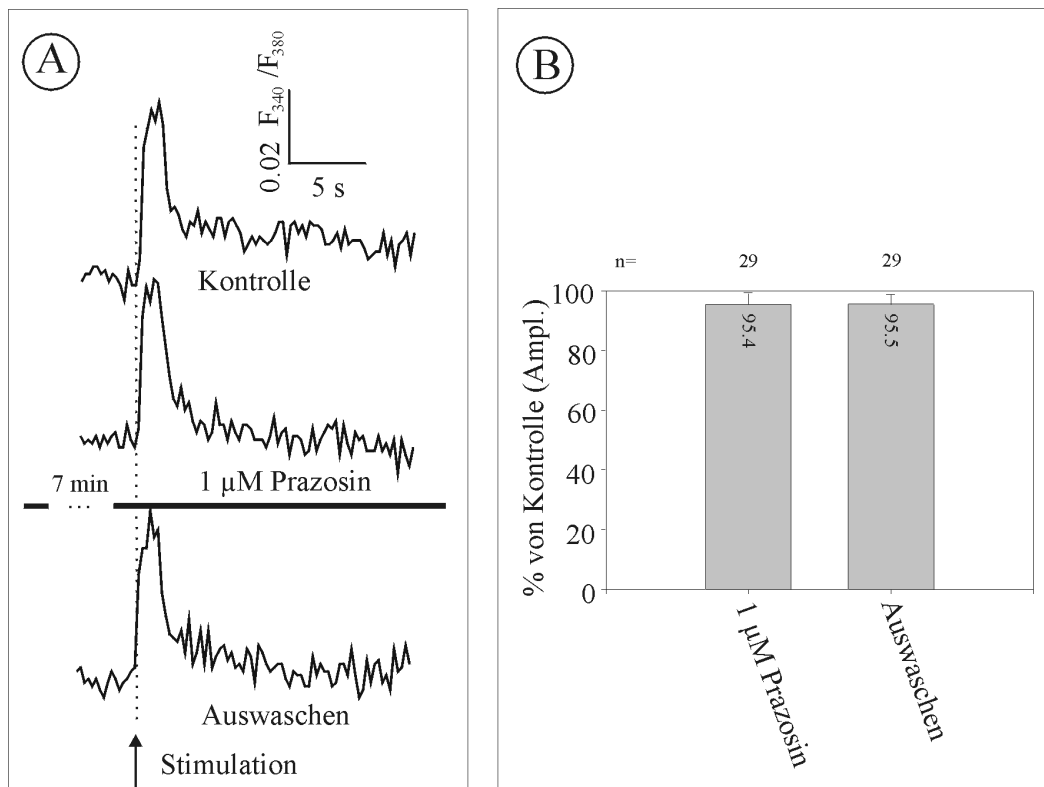


Abbildung 15: Wirkung von Prazosin auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation von 1 μM Prazosin. Prazosin ist in dieser Konzentration nicht effektiv, um somatische Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern zu unterdrücken. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 1 μM Prazosin nahezu unverändert (95.4 %). Die Reaktion bleibt im Mittel nach dem Auswaschen des Blocker unverändert (95.5 %). Der gepaarte t-Test (n=29) kann keine signifikanten Effekte finden.

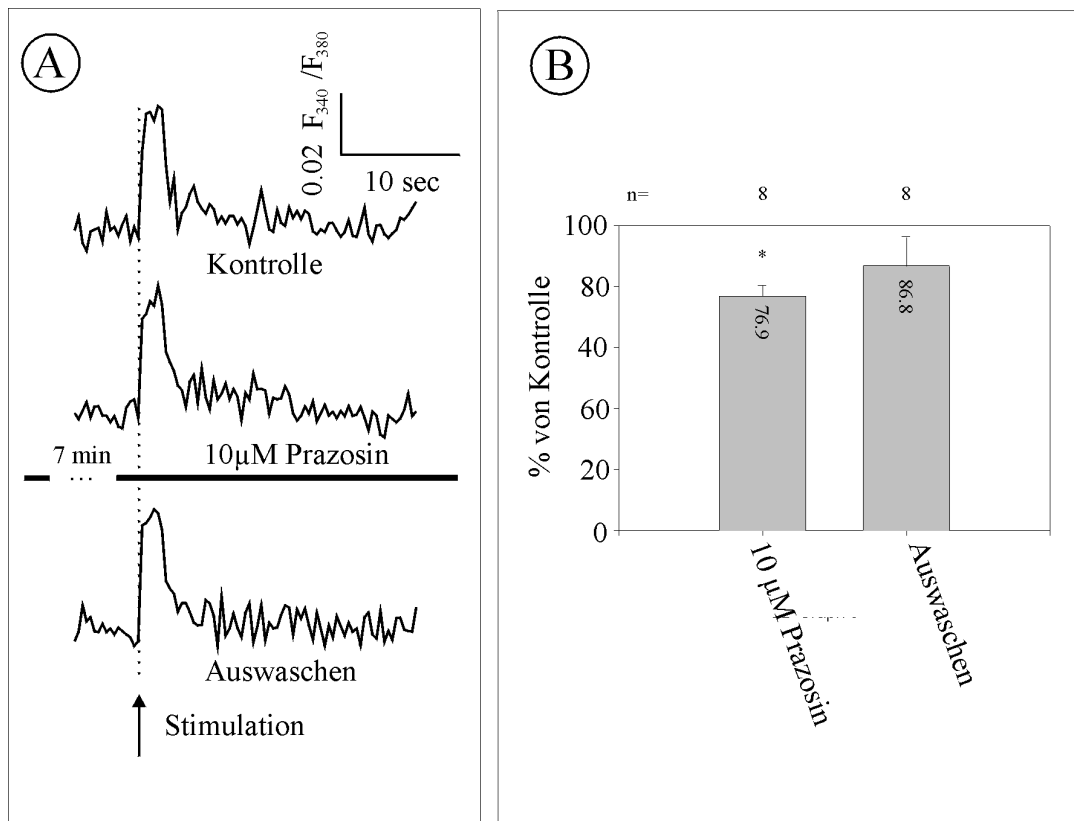


Abbildung 16: Wirkung von Prazosin auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation von 10 µM Prazosin. Die Anwesenheit von 10 µM Prazosin reduziert die stimulationsvermittelten somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen. Dieser Effekt ist aber nicht umkehrbar. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 10 µM Prazosin auf 76,9 % reduziert. Nach dem Auswaschen des Antagonisten steigt die Reaktion wieder auf 86,8 % der Kontrolle an. Der gepaarte t-Test (n=8) erkennt die Applikation des Antagonisten als signifikanten Effekt, die Erholung des Signals nach Auswaschen des Blockers ist aber nicht signifikant.

4.4.1 Die Rolle $\alpha 1$ -adrenerger Rezeptoren

Mit Hilfe des für $\alpha 1$ -adrenerge Transmitterrezeptoren spezifischen Antagonisten Prazosin wurde die Beteiligung der Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin an stimulationsvermittelten Kalziumsignalen in Bergmann Gliazellen untersucht.

Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen diente, wurde 1 µM bzw. 10 µM Prazosin eingewaschen. Die Stimulation der Parallelfasern in Gegenwart von Prazosin wurden 3-7 min nach dem Einwaschen durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen werden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel einer solchen Sequenz wird in Abb. 15 für 1 µM Prazosin und in Abb. 16 für 10 µM Prazosin gezeigt. Eine

Veränderung der Form oder Amplitude in Gegenwart von Prazosin läßt sich in keiner der benutzten Konzentrationen nachweisen. Die statistische Auswertung unterscheidet sich für die beiden verwendeten Konzentrationen. In einer Konzentration von 1 μM zeigt der gepaarte t-Test ($n=29$) keine signifikanten Effekte. Die Reaktionen bleiben bei 95.4 % (von Kontrolle) in Gegenwart des Blockers und bei 95.5 % nach dem Auswaschen des Blockers stehen. Bei einer Applikation von 10 μM Prazosin ist eine signifikante Reduktion der geblockten Reaktion auf 76.9 % der Bezugsmessung zu beobachten. Nach dem Auswaschen des Blockers kann das Signal aber nicht signifikant wiederhergestellt werden (gepaarter t-Test, $n=8$, 86.8 % von Kontrolle). Prazosin ist in keiner der getesteten Konzentrationen effektiv, um die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu blockieren. Der Effekt der bei einer Konzentration von 10 μM auftritt kann nicht unbedingt gewertet werden, da er nicht reversibel ist.

4.4.2 Histamin

Wie in der Arbeit von Kirischuk et al. (Kirischuk, et al., 1996) gezeigt worden ist, stellt Histamin in einer Konzentration von mindestens einem μM einen Kalziumagonisten auf Bergmann Gliazellen dar. Mit Hilfe pharmakologischer Mittel konnte gezeigt werden, daß Bergmann Gliazellen über H_1 -Histaminrezeptoren verfügen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt über den PLC-IP₃ Weg eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Signale sind Thapsigargin sensitiv, so daß man auf eine Beteiligung der Kalziumspeicher im endoplasmatischen Retikulum schließen kann. Um die Beteiligung von H_1 -Histaminrezeptoren an Kalziumsignalen im Falle elektrischer Stimulation der Parallelfasern zu untersuchen, sind zwei Ansätze verwendet worden. Zum einen ist die Wirksamkeit des spezifischen H_1 -Antagonisten Chlorpheniramine untersucht worden und zum anderen kann das Ergebnis des Versuchs in Gegenwart von Thapsigargin verwendet werden (Abb. 14).

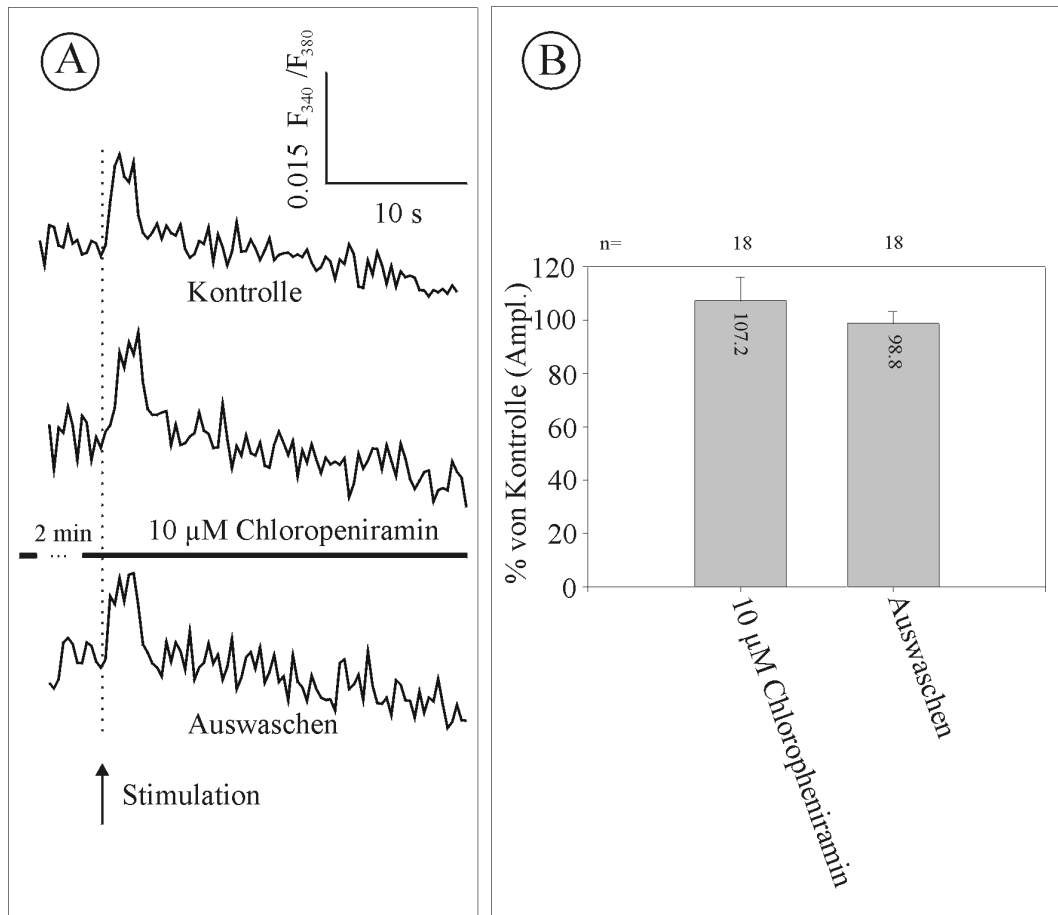


Abbildung 17: Wirkung von Chlorpheniramin auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation von 10 µM Chlorpheniramin. 10 µM Chlorpheniramin ist nicht effektiv, um somatische Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern zu unterdrücken. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 10 µM Chlorpheniramin leicht erhöht (107.2 %). Die Reaktion bleibt im Mittel nach dem Auswaschen des Blocker unverändert (98.8 %). Der gepaarte t-Test (n=18) kann keine signifikanten Effekte finden.

4.4.3 Die Rolle des H₁-Histaminrezeptoren

Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen dient, wird 10 µM Chlorpheniramin eingewaschen. Stimulationen der Parallelfasern in Gegenwart des Antagonisten werden 2 min nach dem Einwaschen durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen werden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird in Abb. 17 gezeigt. Die statistische Auswertung in Abb. 17 B zeigt, daß die Erhöhung der maximalen Reaktionsamplitude auf 107.2 % in Gegenwart des Blockers durch einen gepaarten t-Test (n=18) als nicht signifikant beurteilt wird. Die anschließende Reduktion der Signalamplitude auf 98.8 % der ersten Stimulation nach dem

Auswaschen des Antagonisten ist ebenfalls nicht signifikant (gepaarter t-Test, n=18). Cholorpheniramin ist in der beschriebenen Verwendungsweise nicht effektiv, um die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu blockieren.

Ebenso wie im Falle der α 1-adrenergen Rezeptoren kann der in Abb. 14 gezeigte Versuch herangezogen werden, um eine Beteiligung der H₁-Histaminrezeptoren an dem zytosolischen Kalziumanstieg auszuschließen. Die H₁-Histaminrezeptoren sind G-Protein gekoppelt und wirken auf die IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums und setzen Kalzium aus intrazellulären Speichern frei. Da in dem Versuch dieser Signalweg ausgeschlossen wurde, kann man den Versuch als weiteren Hinweis werten, daß die H₁-Histaminrezeptoren nicht an den stimulationsvermittelten Kalziumsignalen beteiligt sind.

4.4.4 Endothelin

Wie in der Arbeit von Tuschik et al. (Tuschick, et al., 1997) gezeigt worden ist, stellt jede der drei Isoformen ET-1, ET-2 und ET-3 von Endothelin in einer Konzentration von mindestens 0.1 μ M einen Kalziumagonisten auf Bergmann Gliazellen dar. Durch eine Affinitätsstudie konnte gezeigt werden, daß Bergmann Gliazellen über ET_B-Rezeptoren verfügen. Eine Besonderheit dieser Rezeptoren stellt die schnelle Desensitivierung der Rezeptoren dar, die vermutlich auf eine Internalisierung zurückgeht. Schon bei der zweiten Applikation auf eine Zelle sind Endothelin Isoformen kaum noch in der Lage, ein meßbares Signal hervorzurufen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt über den PLC-IP₃ Weg eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Signale sind Thapsigargin sensitiv, so daß man auf eine Beteiligung der Kalziumspeicher im endoplasmatischen Retikulum schließen kann. Um die Beteiligung von ET_B-Rezeptoren an Kalziumsignalen im Falle elektrischer Stimulation der Parallelfasern zu untersuchen, sind zwei Ansätze verwendet worden. Es wurde die Wirksamkeit des spezifischen ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ788 untersucht. Dabei wurde auch der inhibierende Effekt durch Desensitivierung ausgenutzt, indem vor Gabe des Blockers für 30s der spezifische Agonist BQ3020 appliziert wurde. Außerdem kann das Ergebnis des Versuchs in Gegenwart von Thapsigargin herangezogen werden Abb. 14.

4.4.5 Die Rolle des ET_B-Rezeptor

Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen dient, wird μM BQ3020 eingewaschen, um die Desensitivierung auszulösen. Anschließend wurde BQ788 appliziert. Stimulationen der Parallelfasern in Gegenwart des Antagonisten werden 10 min nach dem Einwaschen durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen werden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird in Abb. 18 gezeigt. Wie die statistische Auswertung in Abb. 18 B) zeigt, ist BQ788 und die durch BQ3020 ausgelöste Desensitivierung nicht effektiv, um die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu blockieren.

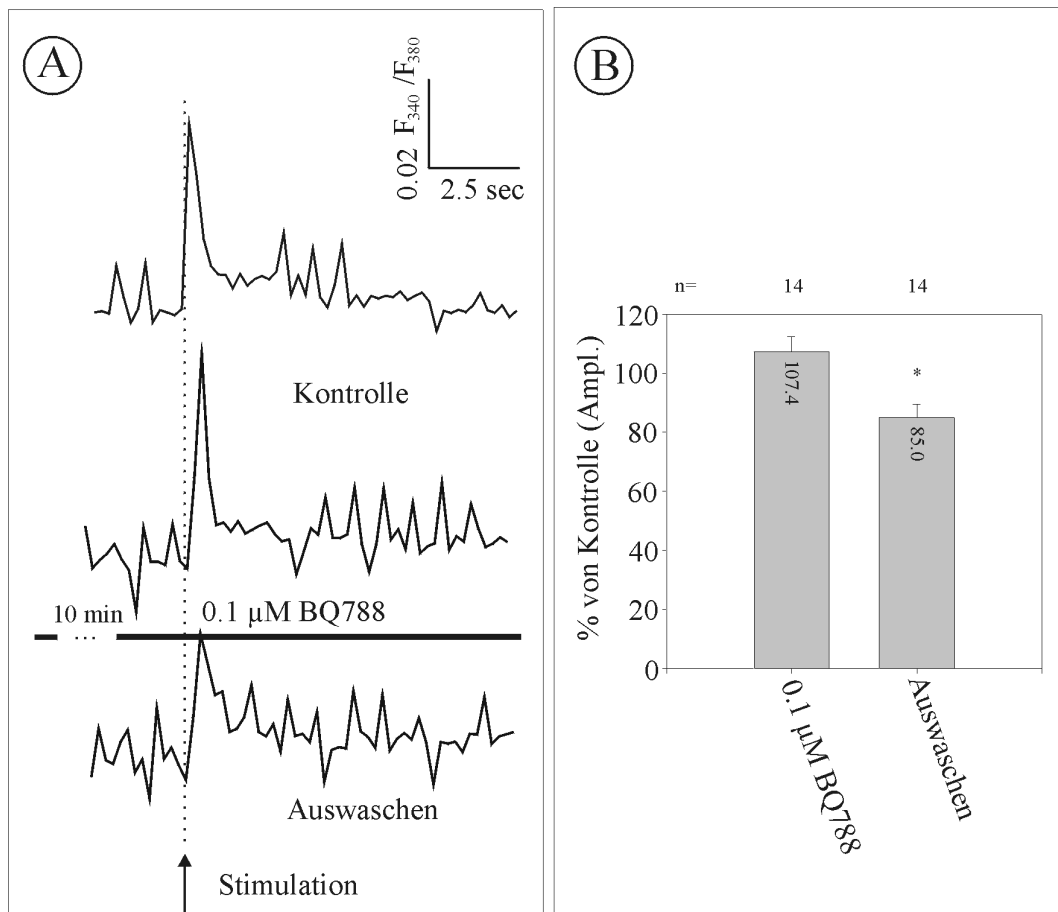


Abbildung 18: Wirkung von BQ788 auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation des Blockers. 0.1 μM BQ788 ist nicht effektiv, um somatische Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern zu unterdrücken. Vor dem Antagonisten wurde der ET_B-Rezeptor Agonist BQ3020 appliziert, um den Rezeptor zu desensitivieren. Der Antagonist zeigt keine erkennbare Wirkung. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation von BQ788 und BQ3020. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in

Gegenwart von 0.1 μ M BQ788 leicht erhöht (107.4 %). Die Reaktion reduziert sich im Mittel nach dem Auswaschen des Blocker auf 85.0 % der Kontrolle. Der gepaarte t-Test (n=14) kann keine signifikanten Effekte finden.

Ebenso wie im Falle der α 1-adrenergen Rezeptoren kann der in Abb. 14 gezeigte Versuch herangezogen werden, um eine Beteiligung der ET_B-Rezeptoren an dem zytosolischen Kalziumanstieg auszuschließen. Die ET_B-Rezeptoren wirken auf die IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums und setzen Kalzium aus diesem intrazellulären Speicher frei. Da dieser Signalweg in dem Versuch ausgeschlossen ist, kann man das Experiment als weiteren Hinweis werten, daß die ET_B-Rezeptoren nicht an den stimulationsvermittelten Kalziumsignalen beteiligt sind.

4.5 Die Rolle von Glutamat bei stimulationsvermittelten Kalziumantworten

Glutamat ist der hauptsächliche Neurotransmitter der Körnerzellen. Bei elektrischer Stimulation der Parallelfasern erwartet man in erster Linie eine Ausschüttung von Glutamat. Auf Bergmann Gliazellen sind sowohl ionotrope Glutamatrezeptoren vom AMPA/Kainate Typ als auch metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I nachgewiesen worden. Außerdem exprimieren die Zellen Glutamattransporter. Daher wurde in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit auf die Pharmakologie der Glutamatrezeptoren und Transporter verwendet.

4.5.1 Einzelapplikationen von Glutamatrezeptor Antagonisten

In dieser Arbeit wurden spezifische Antagonisten für die einzelnen Arten von Glutamatrezeptoren bzw. Glutamattransporter verwendet, um den jeweilige Anteil an den stimulationsvermittelten Kalziumreaktionen zu bestimmen. Hierbei handelt es sich insbesondere um Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ, die auf Bergmann Gliazellen anders als auf Neuronen kalziumpermeabel sind (Müller, et al., 1992). Außerdem wurden metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I mit einer Reihe verschiedener Antagonisten untersucht.

1.6.1.1 Metabotrope Glutamatrezeptoren

Wie Lopez et al. (Lopez, Colome AM, Ortega, et al., 1997) zeigen konnten, lösen spezifische Agonisten für metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen aus. Die Aktivierung dieser Rezeptoren

bewirkt über den PLC-IP₃ Weg eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Signale sind Thapsigargin sensitiv, so daß man auf eine Beteiligung der Kalziumspeicher im endoplasmatischen Retikulum schließen kann. Das Ergebnis des Versuchs unter Benutzung von Thapsigargin kann zu einer Aussage über die Beteiligung metabotroper Glutamatrezeptoren herangezogen werden (Abb. 14).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Antagonisten AIDA, E4CPG, CPCCO und ein Cocktail aus AIDA, E4CPG und PhCCC eingesetzt. Alle Blocker (auch innerhalb des Cocktails) wurden in einer Konzentration 100 µM verwendet.

Unter diesen Blockern erwies sich einzig die Applikation von AIDA als wirkungsvoll (Abb. 20). In der Applikation führt es zu einer Reduktion der Antwort auf 77.7 %. Dieser Effekt läßt sich durch Auswaschen des Blockers umkehren. Die Antwort erreicht dann im Mittel 98.2 % des Ausgangssignals. Sowohl die Reduktion als auch die Wiederherstellung des Signals werden durch den gepaarten t-Test (n=7) als signifikant erkannt.

Der Antagonist E4CPG war nicht geeignet, die stimulationsvermittelten Antworten zu reduzieren (Abb. 19). Im Gegenteil stieg die Reaktionsamplitude auf 106.4 % der Bezugsreaktion an. Auch nach dem Auswaschen des Blockers blieb die Reaktionsamplitude mit 108.9 % geringfügig über dem Ausgangssignal. Der gepaarte t-Test (n=10) erkennt diese Änderung nicht als signifikant.

Ebenso ineffektiv erwies sich die Substanz CPCCO. Nach Applikation des Blockers reduzierte sich die Signalamplitude auf 92.7 % der Bezugsreaktion. Nach dem Auswaschen erholte sich die Kalziumreaktion auf 98.2 %. Ein gepaarter t-Test (n=7) erkennt diese Änderungen als nicht signifikant.

Die Applikation der Blockercocktails bewirkte eine Reduktion der Kalziumantwort auf 95.6 %. Diese Änderung ist nach Aussage des gepaarten t-Tests (n=17) ebenfalls nicht signifikant. Nach Auswaschen des Cocktails ergab sich eine weitere Reduktion auf 82.0 % des Ausgangssignals, die ebenfalls keine signifikante Änderung (gepaarter t-Test, n=17) gegenüber der blockierten Kalziumantwort darstellt.

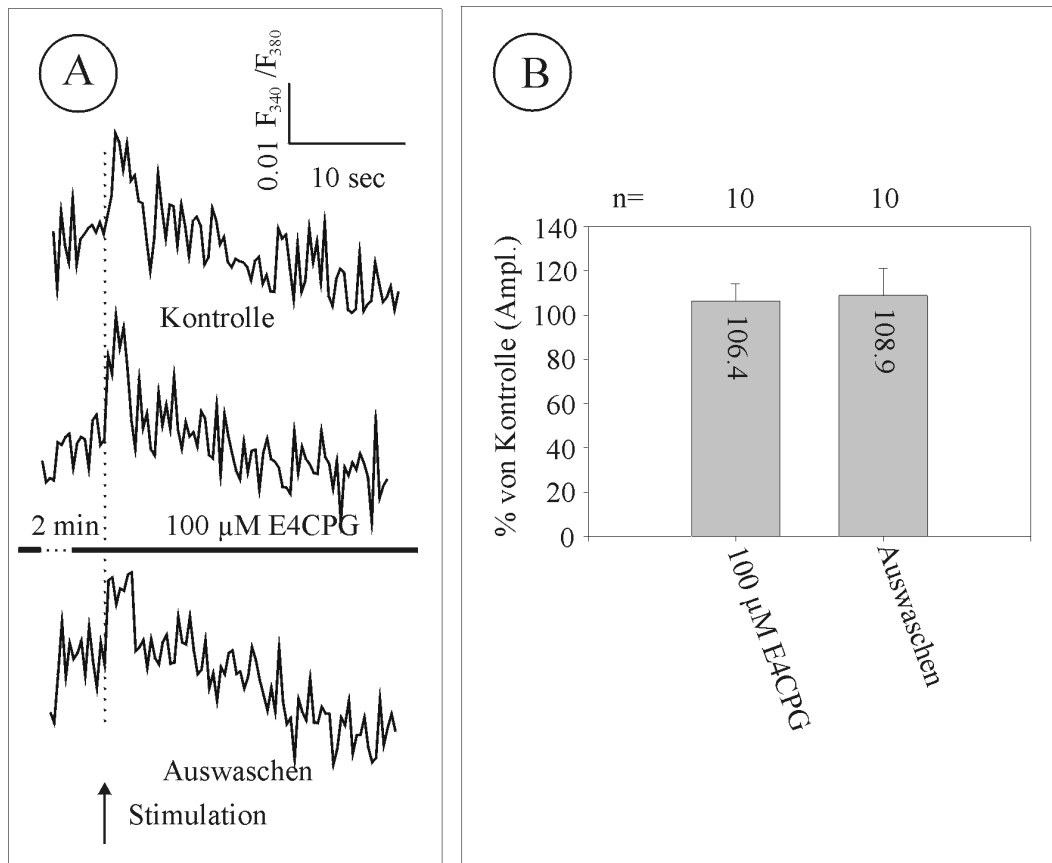


Abbildung 19: Wirkung von E4CPG auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation des Blockers. 100 μ M E4CPG ist nicht effektiv, um somatische Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern zu unterdrücken. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 100 μ M E4CPG leicht erhöht (106.4 %). Die Reaktion bleibt im Mittel nach dem Auswaschen des Blockers unverändert (108.9 %). Der gepaarte t-Test (n=10) weist keinen signifikanten Effekt nach.

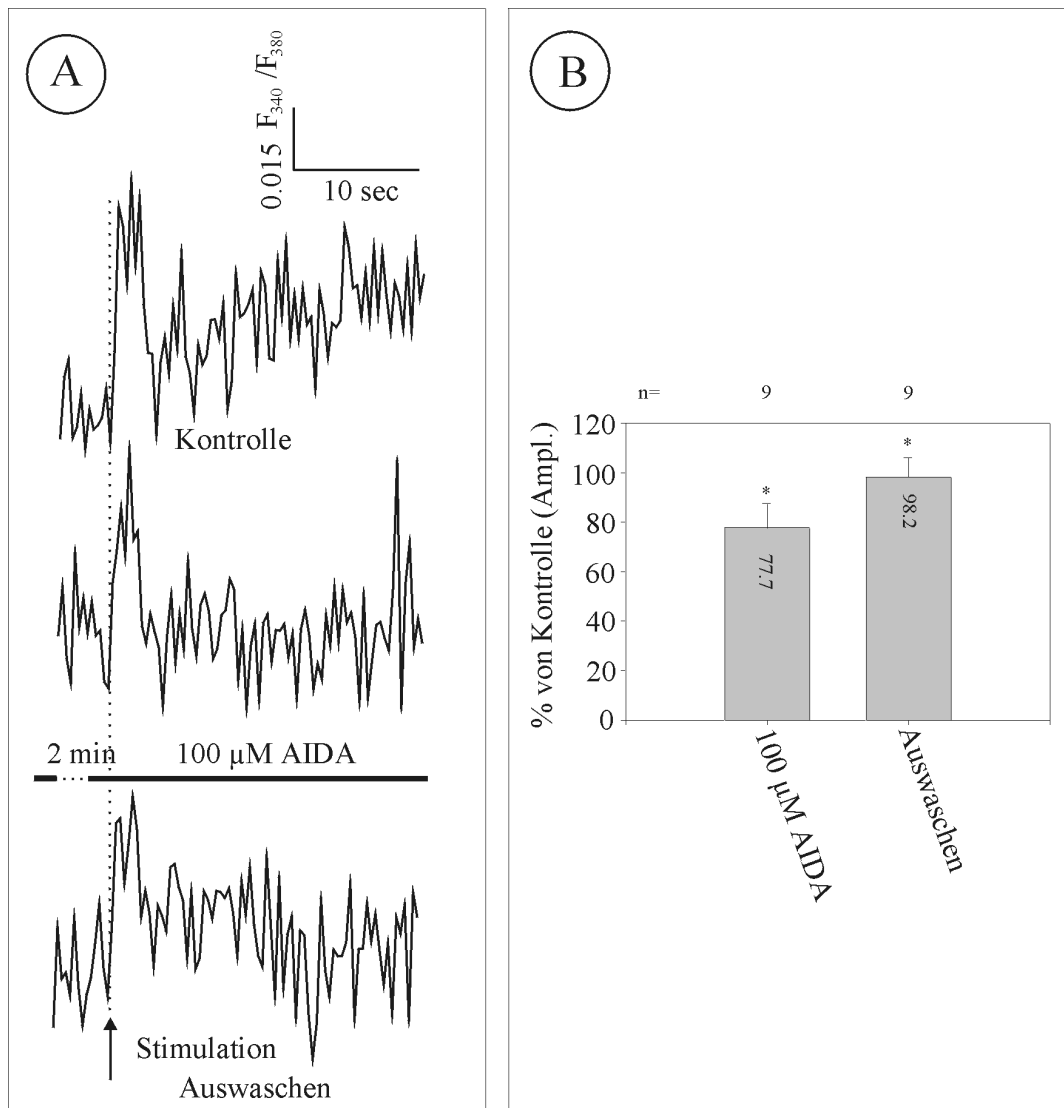


Abbildung 20: Wirkung von AIDA auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach des Blockers. 100 µM AIDA bewirkt eine Reduktion der somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 100 µM AIDA deutlich auf 77.7 % verringert. Die Reaktion kann nach dem Auswaschen des Blocker nahezu unverändert (98.2 %) reproduziert werden. Der gepaarte t-Test (n=9) erkennt einen signifikanten Unterschied sowohl im Verhältnis der Reaktion vor und während, als auch im Verhältnis während und nach Applikation des Blockers.

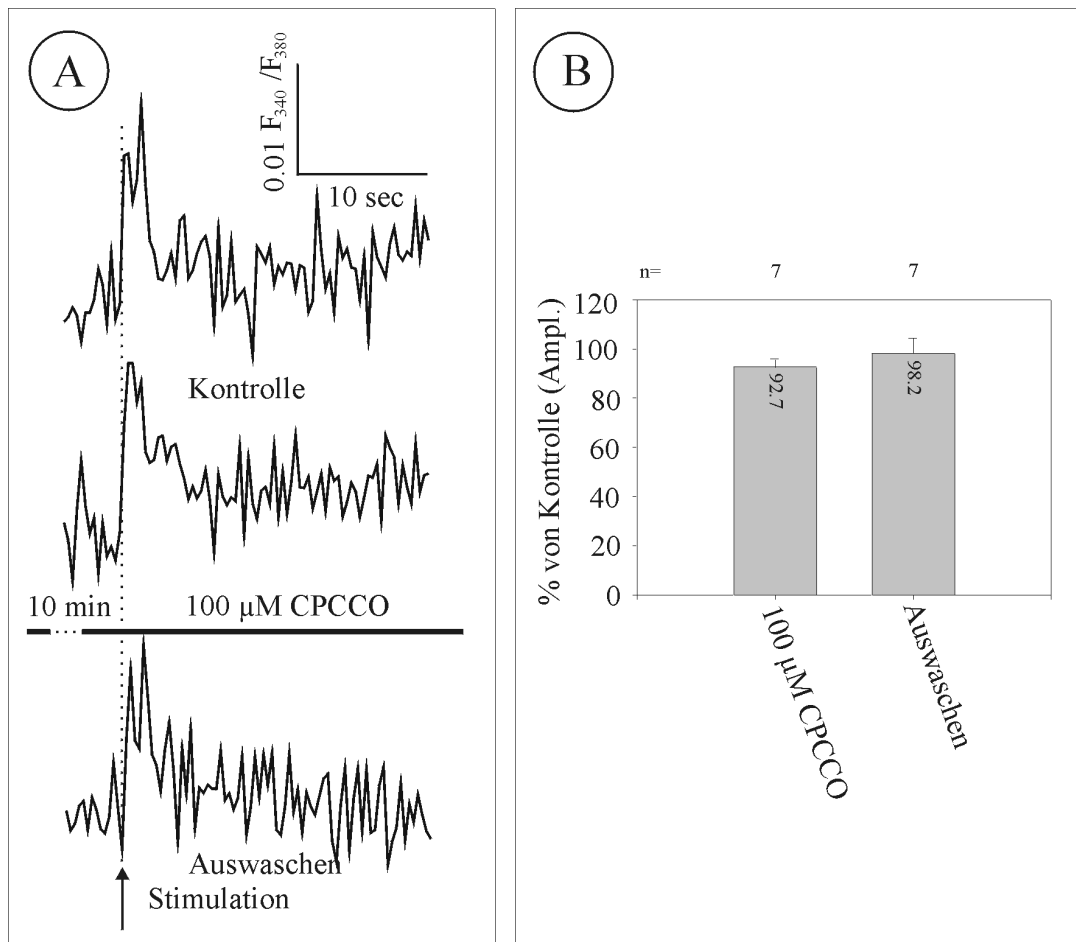


Abbildung 21: Wirkung von CPCCO auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation des Blockers. 100 µM CPCCO ist nicht effektiv, um somatische Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern zu unterdrücken. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 100 µM CPCCO auf 92.7 % reduziert. Die Reaktion bleibt im Mittel auch nach dem Auswaschen des Blockers unverändert (98.2 %). Der gepaarte t-Test (n=7) weist keinen signifikanten Effekt nach.

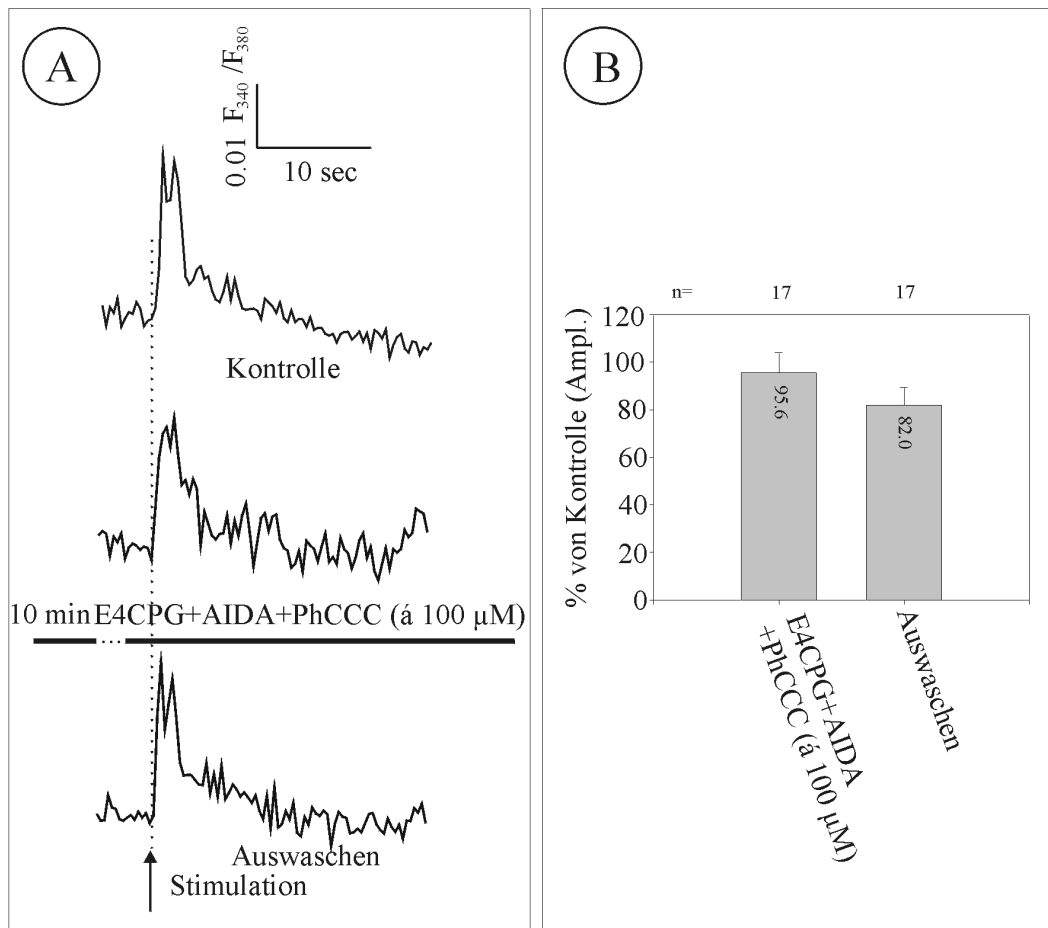


Abbildung 22: Applikation eines Cocktails von Antagonisten für metabotrope Glutamaterezeptoren auf Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen bei elektrischer Stimulation A) Der Cocktail verschiedener Antagonisten, spezifisch für metabotrope Glutamaterezeptoren, bestehend aus 100 µM E4CPG, 100 µM AIDA und 100 µM PhCCC, ist nicht effektiv, um somatische Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern zu unterdrücken. Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation des Cocktails. Die Applikation läßt keine Wirkung erkennen. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation der Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude bleibt in Gegenwart des Cocktails nahezu gleich (95.6 %). Nach dem Auswaschen des Blockers reduziert sich die maximale Reaktionsamplitude im Mittel auf 82.9 %. Der gepaarte t-Test (n=17) erkennt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich von Blocker und Kontrolle oder im Vergleich von Gegenwart des Blockers und der Stimulation nach dem Auswaschen des Blockers.

4.5.1.1 Glutamaterezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ

Glutamaterezeptoren vom AMPA/Kainate-Typ sind in Bergmann Gliazellen, anders als auf anderen Zellen kalziumpermeabel. Da sie ionotrop funktionieren, also nicht von den intrazellulären Kalziumspeichern des endoplasmatischen Retikulums abhängen, fallen sie als möglicher Übertragungsweg nicht durch das Experiment in Verbindung mit Thapsigargin aus. Sie lassen sich zuverlässig und spezifisch durch CNQX blockieren.

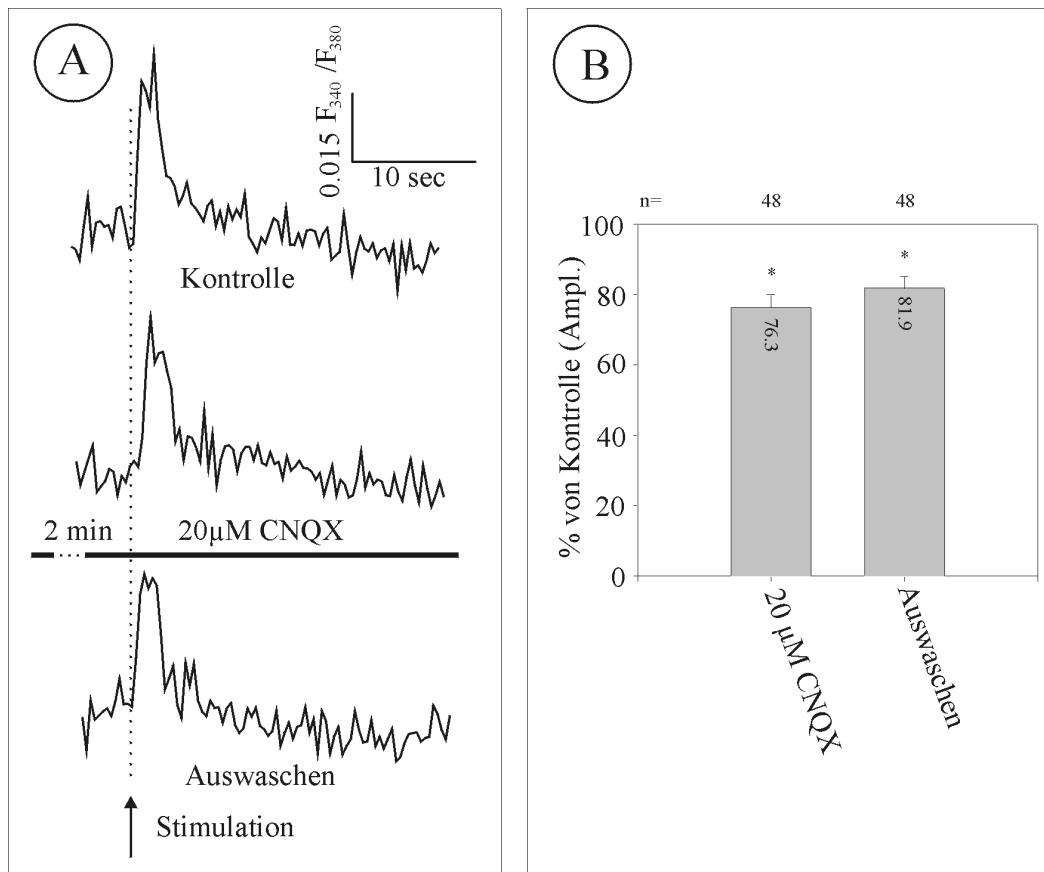


Abbildung 23: . Wirkung von CNQX auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation des Blockers. Die Applikation läßt in der Spur keine sichtbare Wirkung erkennen. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 20 µM CNQX deutlich auf 76.3 % verringert. Die Reaktion kann nach dem Auswaschen des Blockers nur reduziert (81.9 %) reproduziert werden. Der gepaarte t-Test (n=48) erkennt einen signifikanten Unterschied sowohl im Verhältnis der Reaktion vor und während, als auch im Verhältnis während und nach Applikation des Blockers.

Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen dient, wird 20 µM CNQX appliziert. Stimulationen der Parallelfasern in Gegenwart des Antagonisten werden 2 min nach dem Einwaschen durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen werden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird in Abb. 23 gezeigt. Die statistische Auswertung in Abb. 23 B) zeigt, daß in Gegenwart des Antagonisten eine Reduktion des Signals auf 76.3 % des Ausgangssignals eintritt. Nach dem Auswaschen von CNQX erholt sich das Signal auf 81.9 % der ursprünglichen Amplitude. Ein gepaarter t-Test (n=48) ergibt, daß beide Änderungen signifikant sind. Mit CNQX ist es in der beschriebenen Verwendungsweise möglich, die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu reduzieren.

4.5.2 Die Rolle von Glutamattransportern

Glutamattransporter sind Membrankanäle, die im Kotransport mit Glutamat drei Natriumionen und ein Proton aufnehmen. Die Aktivität von Glutamattransportern kann zu einer deutlichen und meßbaren Erhöhung des intrazellulären Natriumspiegels führen. Durch die hohe Konzentration intrazellulären Natriums kann es zu einer Umkehrung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers kommen. Dies führt wiederum zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels. Eine Blockade des Transporters ist durch den kompetitiven Inhibitor l-PDC möglich.

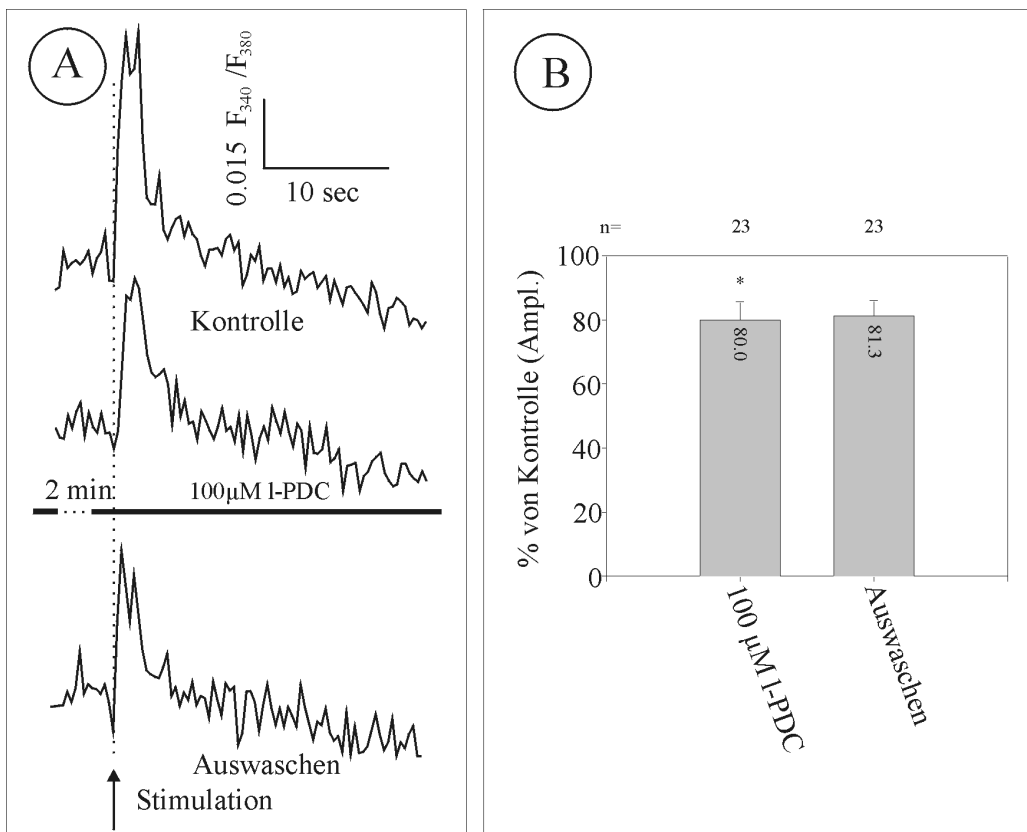


Abbildung 24: Wirkung von l-PDC auf die somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation. A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation von 100 µM l-PDC. Die Applikation läßt in der Spur keine sichtbare Wirkung erkennen. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 100 µM l-PDC deutlich auf 80,0 % verringert. Der blockierte Anteil der Reaktion kann nach dem Auswaschen des Blockers nicht wieder (81,3 %) reproduziert werden. Der gepaarte t-Test (n=23) erkennt einen signifikanten Unterschied sowohl im Verhältnis der Reaktion vor und während Applikation des Blockers. Im Verhältnis während und nach Applikation des Blockers kann der gepaarte t-Test (n=23) keinen Unterschied erkennen.

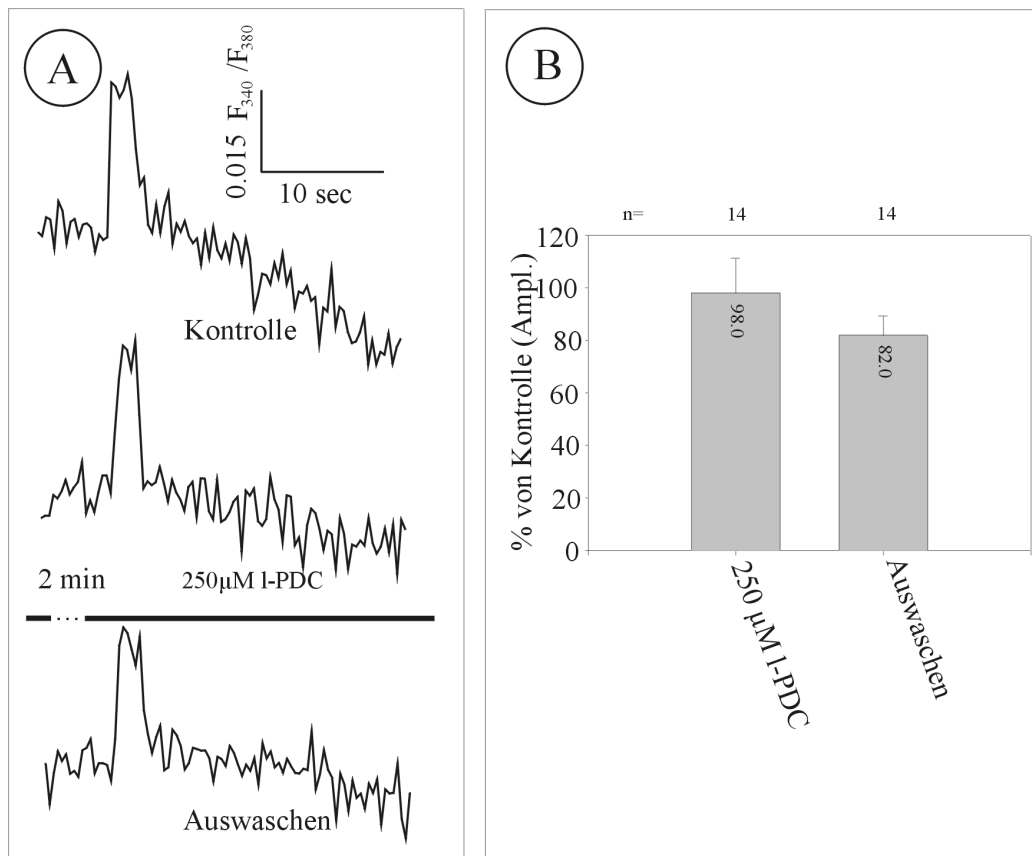


Abbildung 25: Wirkung von l-PDC auf die Kalziumantworten von Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach des Blockers. 250 µM l-PDC bewirkt keine Änderung der somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 250 µM l-PDC mit 98.0 % der Ausgangsamplitude nahezu unverändert. Nach dem Auswaschen des Blockers fällt die mittlere Signalamplitude auf 82.0 % des Ausgangssignals ab. Der Wilcoxon-Test (n=14) erkennt in keiner der Änderungen einen signifikanten Unterschied.

Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen dient, wurde 100 µM bzw 250 µM l-PDC eingewaschen. Stimulationen der Parallelfasern in Gegenwart des Antagonisten wurden 2-5 min nach dem Einwaschen durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen wurden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird für eine Applikation von 100 µM l-PDC in Abb. 24 und für eine Applikation von 250 µM l-PDC in Abb. 25 gezeigt. In der statistischen Auswertung zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Konzentrationen. Während 100 µM l-PDC zwar mit einer Verminderung auf 80.0 % des Ausgangssignals zu einer deutlichen und signifikanten (gepaarter t-Test, n=23) Reduktion des Signals führt, bleibt die Signalamplitude unter der höheren Konzentration von 250 µM mit einer

Verminderung auf 98.0 % nahezu gleich. Diese Änderung ist nicht signifikant (Wilcoxon-Test, $n=14$). Nach dem Auswaschen von 100 μM l-PDC erholt sich die Signalamplitude nicht mehr signifikant (81.3 %, gepaarter t-Test, $n=23$). Das Auswaschen der Konzentration von 250 μM l-PDC bewirkt eine Reduktion der gemessenen Signalamplitude auf 82.0 %. Diese Änderung wird vom Wilcoxon-Test ($n=14$) nicht als signifikant erkannt. In Anbetracht der widersprüchlichen Resultate für die verschiedenen Konzentrationen läßt nicht der Schluß ziehen, daß es mit l-PDC in der beschriebenen Verwendungsweise möglich ist, die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu blockieren.

4.5.3 Kombination von Antagonisten für Glutamat vermittelte Kalziumreaktionen

Da sich bei der Applikation von Antagonisten einzelner, durch Glutamat geöffneter Eintrittswege für Kalzium in das Zytosol nur eine teilweise Inhibierung erreichen ließ, wurde eine Kombination von Antagonisten für die bekannten Glutamat induzierten Kalziumeintrittswege appliziert.

Nach einer Kontrollstimulation (Zeitpunkt a), die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen dient, wird die SERCA-Pumpe irreversibel durch die Gabe von 1 μM Thapsigargin blockiert. Anschließend wurde durch eine Applikation von 100 μM ATP für 30 sec der Phospholipase C-Inositol-1,4,5-Triphosphat Weg stimuliert, um einen Kalziumaustritt aus dem endoplasmatischen Retikulum zu erreichen. Diese Applikation wurde solange wiederholt, bis sich keine Kalziumtransienten mehr auslösen ließen (Zeitpunkt b für die letzte ATP-Stimulation). Anschließend wurde eine Stimulationen der Parallelfasern durchgeführt (Zeitpunkt c für die elektrische Stimulation). Die nächste Stimulation wurde in Gegenwart von entweder 20 μM CNQX (Protokol I, Zeitpunkt e) oder 100 μM l-PDC (Protokoll II, Zeitpunkt d) durchgeführt, dabei wurde der jeweilige Antagonist 10 min vor der Stimulation eingewaschen. Anschließend wurde der jeweils andere Antagonist hinzugefügt, wobei die Kombination der Blocker für weitere 10 min appliziert wurde, bevor eine Stimulation (Zeitpunkt f) durchgeführt wurde. Weitere Kontrollstimulationen (Zeitpunkt g) wurden 10-20 min nach dem Auswaschen

durchgeführt. Wie die Auswertung in zeigt und wie in Abschnitt bereits ausgeführt wurde, ist Thapsigargin in der beschriebenen Verwendungsweise nicht in der Lage, Einfluß auf die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu nehmen (Zeitpunkt c: Reduktion der Signalamplitude (n=43) auf 94.0 % der Ausgangsamplitude (n=29, Zeitpunkt a), kein signifikanter Unterschied nach dem Mann-Whitney-Test). Die Applikation des Glutamatttransporterantagonist 1-PDC führt zu einer Erhöhung des Signals auf 131.9 % (n=25, Zeitpunkt d) gegenüber der ersten Stimulation (n=29, Zeitpunkt a). Die Änderung (Zeitpunkt d) ist gegenüber der Stimulation nach Leerung der Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums (n=29, Zeitpunkt c) nach den Mann-Whitney-Test signifikant. Wenn man CNQX direkt nach Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher appliziert (n=18, Zeitpunkt e), führt es zu einer Reduktion um 35.6 % auf 58.4 % des Ausgangssignals (Zeitpunkt a) gegenüber der vorangegangenen Stimulation (Zeitpunkt c). Der Mann-Whitney-Test erkennt diese Reduktion nicht als signifikant (Zeitpunkt c, n=29 vs. Zeitpunkt e, n=18). Fügt man den jeweils fehlenden Antagonisten hinzu (Zeitpunkt f, n=36) erhält man einen Wert von 82.7 % der Ausgangsamplitude (Zeitpunkt a). Diese Änderung (Zeitpunkt f) ist gegenüber der Stimulation nach Entleerung der Speicher (Zeitpunkt c) nach dem Mann-Whitney-Test nicht signifikant. Im letzten Schritt wurde durch Auswaschen der Blocker (Zeitpunkt g, n=43) versucht, die gemessenen Effekte umzukehren. Der Vergleich durch den Mann-Whitney-Test mit der vorangegangenen Stimulation (Zeitpunkt f) zeigt keinen signifikanten Unterschied.

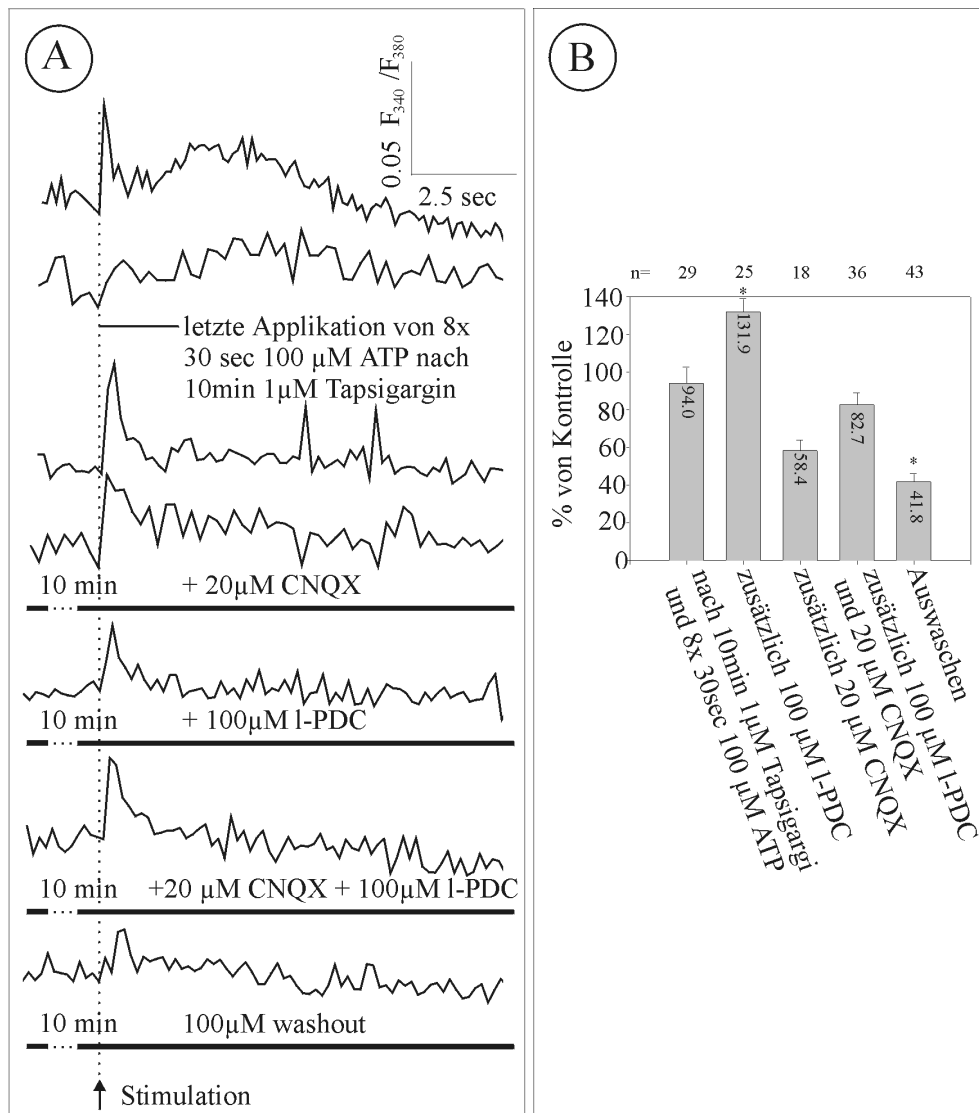


Abbildung 26: Auswirkung gleichzeitiger Blockierung verschiedener glutamaterger Signalwege auf somatische Kalziumantworten auf elektrische Stimulation der Parallelfasern in Bergmann Gliazellen. A) Die gepunktete Linie repräsentiert den Zeitpunkt der Stimulation. a) Kontrollreaktion vor Applikation neuromodulativer Substanzen b) Letzte von 8 Applikationen von 100 μ M ATP nach Gabe von 1 μ M Thapsigargin für 10 min c) Stimulation bei von Kalzium entleertem endoplasmatischem Retikulum d) Applikation von 100 μ M I-PDC für 10 min bei entleertem endoplasmatischem Retikulum (nach Protokoll II) e) Applikation von 20 μ M CNQX für 10 min bei entleertem endoplasmatischem Retikulum (nach Protokoll I) f) Applikation von 20 μ M CNQX und 100 μ M I-PDC für 10 min bei entleertem endoplasmatischem Retikulum (beide Protokolle) g) Nach 10 min Auswaschen von CNQX und I-PDC B) Statistische Auswertung: die Buchstaben c-g repräsentieren Stimulationen, die zu denen im Schema (s. C) angegeben Zeitpunkten durchgeführt wurden. c) Stimulation bei entleertem endoplasmatischem Retikulum d) Applikation von 100 μ M I-PDC für 10 min bei entleertem endoplasmatischem Retikulum (nach Protokoll II) e) Applikation von 20 μ M CNQX für 10 min bei entleertem endoplasmatischem Retikulum (nach Protokoll I) f) Applikation von 100 μ M I-PDC und 20 μ M CNQX für 10 min bei entleertem endoplasmatischem Retikulum (beide Protokolle) g) Reaktion 10 min nach dem Auswaschen aller Blocker C) Applikationsschemata: I: erst CNQX, dann I-PDC, II: erst I-PDC, dann CNQX

4.6 Verstärkung der Reaktion durch Kaliumkanal Antagonisten

4.6.1 Kaliumkanäle terminieren Aktionspotentiale

Im Zuge eines Aktionspotentials kommt es in der ersten Phase zu einer schnellen Depolarisation der Membran durch die Öffnung spannungsaktivierter Natriumkanäle. Die Depolarisation führt im zweiten Schritt zur Öffnung spannungsaktivierter Kaliumkanäle, welche die Zellmembran hyperpolarisieren und weitere Aktionspotentiale während der Refraktärzeit unterbinden. Dieser Mechanismus ist für die Untersuchung von Neuron-Glia Interaktionen interessant, da sich durch eine Blockade der Kaliumkanäle die Depolarisation nach einem Aktionspotential länger aufrecht erhalten läßt. In der Folge sind die spannungsaktivierten Kalziumkanäle an den präsynaptischen Endigungen länger geöffnet. In der Konsequenz wird mehr Neurotransmitter in den synaptischen Spalt entlassen. Um die Auswirkung dieses Mechanismus zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Wirkung des Kaliumkanalblockes 4-AP auf die stimulationsvermittelten Kalziumantworten untersucht.

4.6.2 Blockade von Kaliumkanälen führt zur Verstärkung stimulationsvermittelter Kalziumantworten

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt eine Rolle in dem Modellsystem der Parallelfaser in Verbindung mit der Bergmann Gliazelle spielt, wurde der für spannungsaktivierte Kaliumkanäle spezifische Antagonist 4-AP appliziert. Nach einer Kontrollstimulation, die als Referenz für die nachfolgenden Signalgrößen dient, wurde 500 μM 4-AP eingewaschen. Stimulationen der Parallelfasern in Gegenwart des Antagonisten wurden 3 min nach dem Einwaschen durchgeführt. Weitere Kontrollstimulationen wurden 10-20 min nach dem Auswaschen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für eine solche Sequenz wird in Abb. 27 gezeigt. Die Auswertung zeigt, daß eine Potenzierung der Kalziumantwort im Zellsoma auf 420.7 % stattfindet. Durch Auswaschen des Antagonisten läßt sich die Reaktion wieder auf 144.6 % der Ausgangsreaktion drücken. Der Wilcoxon-Test, der zwischen Ausgangssignal und Reaktion in Gegenwart des Antagonisten berechnet wurde, sowie der Mann-Whitney-Test, der zwischen Gegenwart des Antagonisten und Auswaschen verwendet wurde, zeigen einen signifikanten Effekt an. Der

Kaliumkanalantagonist 4-AP ist äußerst effektiv, um die stimulationsvermittelten Kalziumsignale in den untersuchten Bergmann Gliazellen zu verstärken.

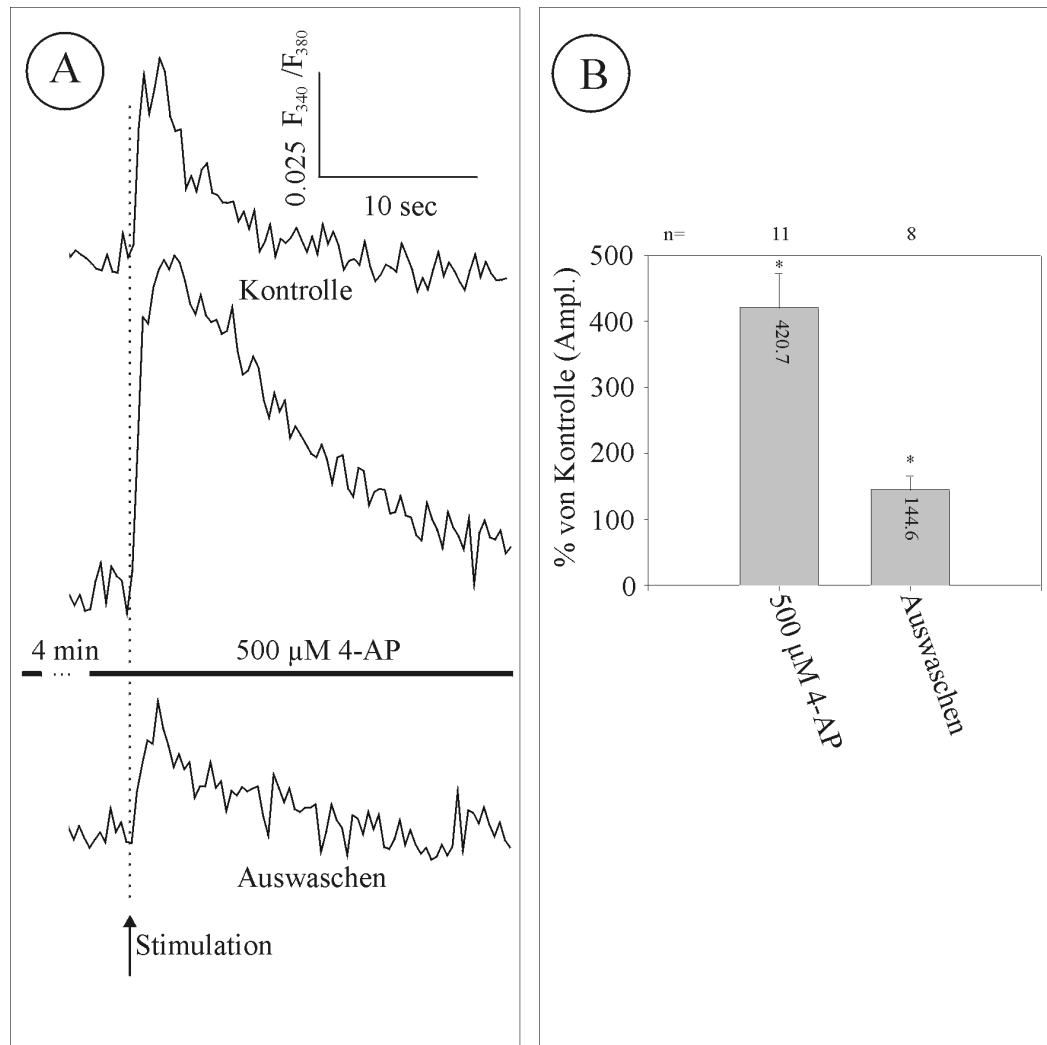


Abbildung 27: Wirkung von 4-AP auf Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation A) Die Kalziumspuren zeigen die Reaktion einer Zelle vor, während und nach Applikation des Blockers. 500 µM 4-AP bewirkt erhebliche Erhöhung der somatischen Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation. Die Kalziumantwort vergrößert sich in der Amplitude und verlängert sich. Nach einem schnellen Anstieg kommt es zu einem exponentiellen Abfall. Die gesamte Reaktion dehnt sich auf über 20 sec aus. Der Pfeil zeigt den Moment der Stimulation. B) Das Diagramm zeigt die Signalamplitude im Verhältnis zur Kontrollmessung vor Applikation des Antagonisten. Die mittlere Reaktionsamplitude ist in Gegenwart von 500 µM 4-AP auf 420.7 % der Ausgangsamplitude vergrößert. Nach dem Auswaschen des Blockers fällt die mittlere Signalamplitude auf 144.6 % des Ausgangssignals ab. Der Wilcoxon-Test (n=11) erkennt den Unterschied des Ausgangssignals zum Signal in Gegenwart von 4-AP einen signifikanten Unterschied. Der Effekt ist nach dem Mann-Whitney-Test (n=11 in Gegenwart des Blockers vs. n=8 nach dem Auswaschen) signifikant umkehrbar.

4.7 Kalziumsignale in Bergmann Gliazellausläufern als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern

Die Ausläufer von Bergmann Gliazellen reagieren bereits auf einen einzigen Spannungspuls mit einer relativ hochohmigen Stimulationselektrode (Grosche, et al., 1999) mit einem meßbaren Kalziumtransienten. In der Veröffentlichung wird gezeigt, daß diese Signale TTX sensitiv sind. Man kann auf eine Neuron-Glia Wechselwirkung schließen.

4.7.1 Darstellung der zeitlichen und räumlichen Ausbreitung des Kalziumsignals in den Ausläufern

Der folgende Abschnitt zeigt eine besondere Auswertung der Meßergebnisse in den Zellausläufern. Dabei geht es um die gleichzeitige Darstellung der räumlichen, wie der zeitlichen Komponenten der Reaktion. Das Ziel der Auswertung ist es, eine etwaige Ausbreitung des Signals mit der Zeit im Raum, wie es im Falle einer Kalziumwelle der Falle wäre, geeignet zu visualisieren.

Vorbild für die Form der Auswertung ist der sogenannte Linescan-Modus der konfokalen Lasermikroskopie. Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben, tastet der Laser bei dieser besonderen Art der fluorometrischen Messung das zu beobachtende Feld zeilenweise ab. Aus den einzelnen Bildpunkten setzt der Computer erst die Zeilen und schließlich das gesamte Bild zusammen. Der Linescan-Modus beschränkt sich von vornherein auf die Abtastung einer einzigen Zeile (dies kann dafür mit sehr hoher Geschwindigkeit geschehen). Da es sich bei dem Zellausläufer um ein im wesentlichen eindimensionales Objekt handelt, wäre es wünschenswert, wenn man die abgetastete Zeile mit dem Ausläufer in Übereinstimmung bringt. Setzt man die einzelnen Zeilen zusammen, so bekommt man ein Bild, das entlang einer Kante den Raum repräsentiert und entlang der andern die Zeit. Die gemessenen Intensitäten bzw. relativen Kalziumkonzentrationen werden im Bild als Graustufen kodiert wiedergegeben.

Die Methode des Linescan-Modus steht zwar in den verwendeten Geräten zur Verfügung, aber die Ausläufer der Zellen stellen sich leider nicht so gerade dar, wie man es für die Verwendung dieser Technik benötigen würde. Daher wurde eine

normale Bildfolge von einer Ausläuferreaktion genommen. Der Ausläufer wurde mit Hilfe mehrerer aufeinanderfolgender Linien nachgezeichnet. Ein speziell in dieser Arbeit entwickeltes Programm geht für jedes Bild der Folge ab und ermittelt für jeden Punkt auf den Linien die gemessene Lichtintensität. Anschließend setzt es die ermittelten Intensitätsverläufe wie einen Linescan zu einem Raum-Zeit-Bild zusammen.

Die Abbildungen 28-30 zeigen drei typische Beispiele für Raum-Zeit-Bilder von Oregon-Green-Bapta-1 gefüllten Bergmann Gliazellausläufern, wie sie als Ergebnis elektrischer Stimulation der Parallelfasern entstehen. Es zeigt sich, daß sich zumindest eine oder mehrere aktive Zonen herausbilden, in der die Zellen reagieren. Es wird offensichtlich, daß sich die Signale in einem räumlich und zeitlich eng definierten Rahmen ereignen. Eine Ausbreitung im Sinne einer Kalziumwelle ließ sich nicht erkennen. Reaktionen fanden im wesentlichen in distalen Zonen des Ausläufers statt.

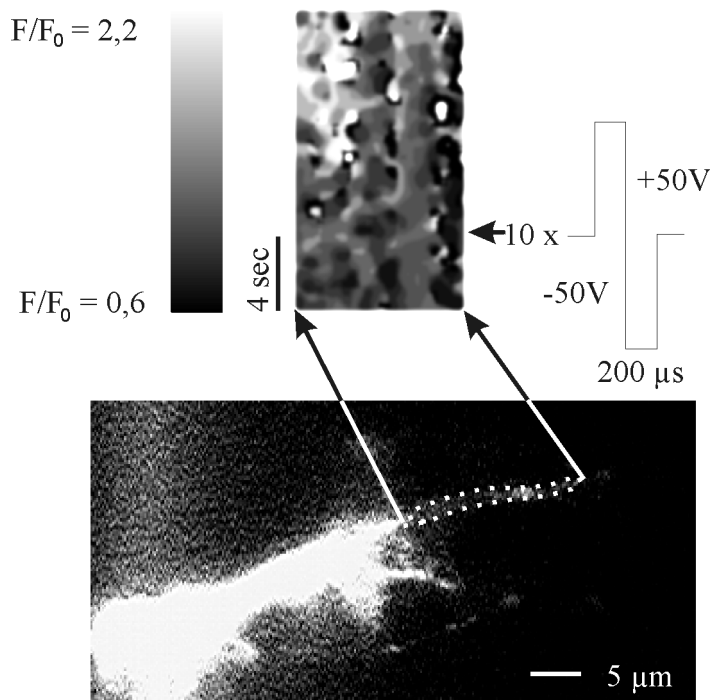


Abbildung 28: Kalziumantworten auf elektrische Stimulation der Parallelfasern in Bergmann Gliazellausläufern. Das Bild zeigt eine spätere, proximale Reaktion auf zehn Pulse. Der distale Teil des Ausläufers ist nicht betroffen.

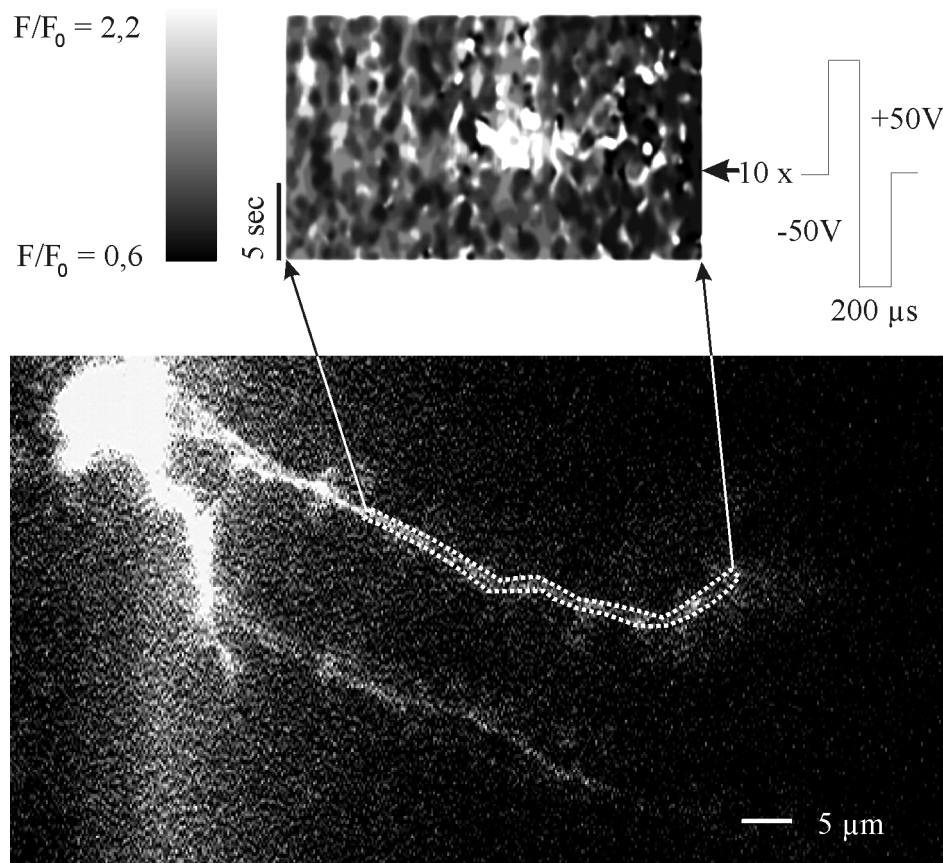


Abbildung 29: Kalziumantworten auf elektrische Stimulation der Parallelfasern in Bergmann Gliazellausläufern. Das Bild zeigt eine frühe, medial gelegene Reaktion auf zehn Pulse. Der distale und proximale Teil des Ausläufers sind nicht betroffen.

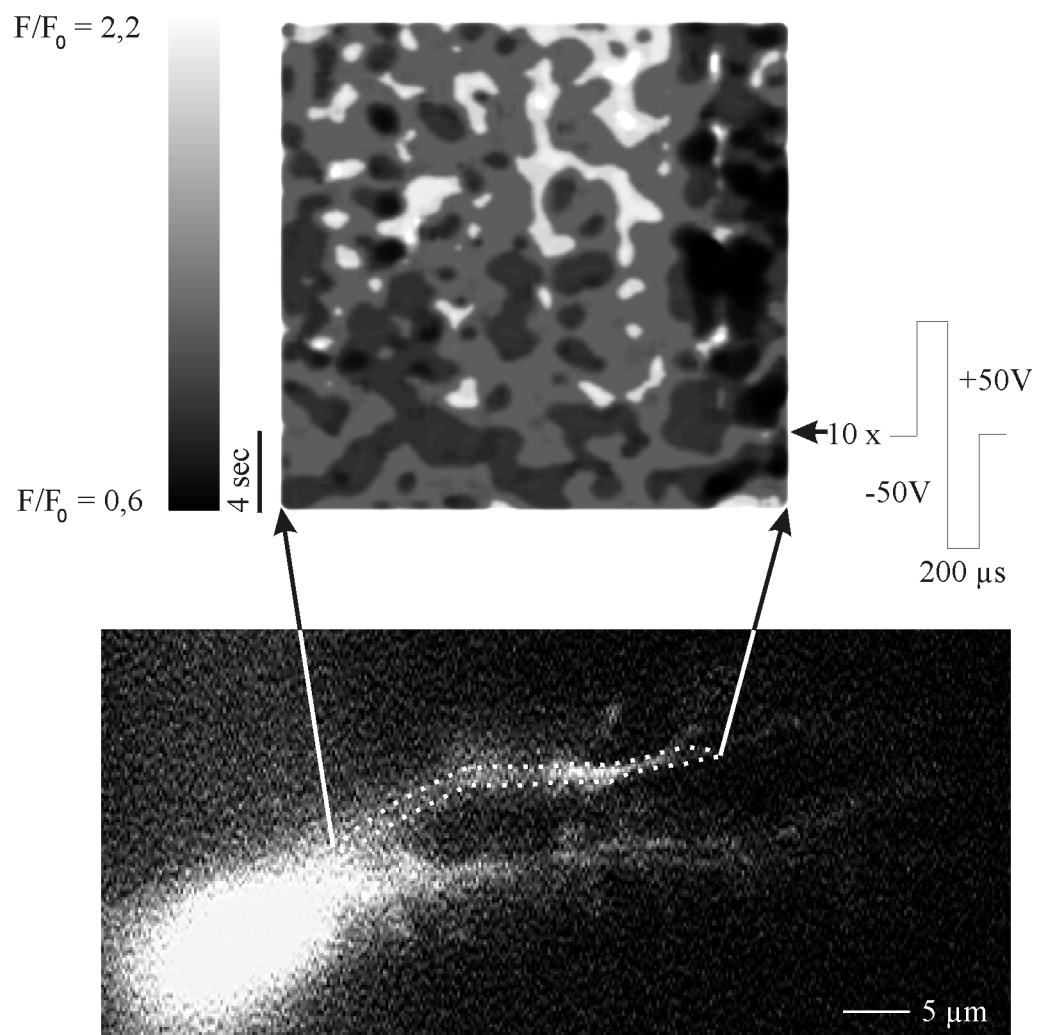


Abbildung 30: Kalziumantworten auf elektrische Stimulation der Parallelfasern in Bergmann Gliazellausläufern. Das Bild zeigt eine frühe Reaktion auf zehn Pulse, die im gesamten Ausläufer stattfindet.

5 Diskussion

5.1 Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern mit Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration reagieren. Dabei konnten Unterschiede zwischen der Empfindlichkeit der Ausläufer und des Somas festgestellt werden. Die Ausläufer reagieren schon auf einen einzigen Spannungspuls mit einer deutlichen Kalziumerhöhung, während das Soma erst auf zehn Pulse mit einer sehr viel größeren Pipette reagiert. Im folgenden wird diskutiert, worauf dieser Mechanismus beruht und was die funktionelle Bedeutung sein könnte.

Kalzium ist einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe in der Zelle. Kalziumerhöhungen können für die Expression von ‚immediate early‘ Genen verantwortlich sein (Lerea, L. et al., 1995). Die Expression dieser Gene kann im weiteren Verlauf den funktionellen Zustand der Zellen beeinflussen.

Kalzium reguliert eine wichtige neuroprotektive Funktion der Astroglia (Wedler, F. et al., 1994). Astrogliazellen nehmen das in hohen Konzentrationen neurotoxische Glutamat auf (Schousboe, et al., 1997), metabolisieren es zu Glutamin und geben es wieder in den Extrazellulärraum ab. Glutamin wird durch aktiven Transport in die umgebenden Neurone aufgenommen, wieder in Glutamat umgewandelt und als solches in den Synapsosomen gesammelt (Schousboe, et al., 1977, Westergaard, et al., 1995). Anschließend steht es für eine erneute Ausschüttung in die Synapse zu Verfügung.

5.1.1 $[Ca^{2+}]_i$ Signale im Soma

Ziel der vorliegenden Arbeit war, regionale Unterschiede der Kalziumantworten verschiedener Zellbereiche als Antwort auf elektrische Stimulation gegenüberzustellen. Es wurde untersucht, ob das Zellsoma ebenso empfindlich auf neuronale Aktivität reagiert wie die Zellausläufer. Ein Vergleich der Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.1 und 4.7.1 zeigt, daß eine erhebliche höhere Reizstärke notwendig ist, um eine somatische Kalziumreaktion auszulösen, als man benötigt, um eine Kalziumreaktion im Ausläufer hervorzurufen. Die somatische Kalziumantwort ist

also durch ihre geringere Sensitivität gegenüber synaptischer Aktivität gekennzeichnet. Mit einer entsprechend gewählten Reizstärke (s. Abschnitt 4.2.1) reagiert die Zelle sofort (im Rahmen der zeitlichen Auflösung) nach der Stimulation mit einem zeitlich eng begrenzten Signal.

In dieser Arbeit ist es gelungen, methodische Probleme auszuschließen, die frühere Ansätze zu Messung somatischer Kalziumantworten auf elektrische Stimulation hatten. Es wurden Experimente in Gegenwart von Blockern neuronaler Aktivität durchgeführt. Die deutliche Reduktion des Effektes durch Kadmium und kalziumfreie Lösung zeigt, daß sich dieser Effekt einwandfrei auf neuronale Aktivität zurückführen läßt. TTX ist sogar in der Lage Kalziumantworten auf elektrische Stimulation vollkommen zu unterbinden. Die Effekte aller drei Blocker sind nahezu vollständig reversibel.

Somatische Kalziumreaktionen von Astrogliazellen auf neuronale Aktivität sind aus der neueren Literatur bekannt. So zeigen Astrogliazellen im optischen Nerv Kalziumantworten auf elektrische Stimulation des Nerven (Kriegler, S. und Chiu, S. Y., 1993). Carsten Ohlemeyer hat im Rahmen seiner Dissertation somatische Kalziumreaktionen von Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation des Corpus callosum gezeigt. Elektrophysiologische Untersuchungen an Bergmann Gliazellen weisen eine Depolarisation der Zellen während elektrischer Stimulation der Parallelfasern nach (Clark, B. A. und Barbour, B., 1997). Kalziumtransienten in Ausläufern von Bergmann Gliazellen wurden von Grosche et. al. (Grosche, et al., 1999) auf elektrische Stimulation der Parallelfasern hin beobachtet. Eine Untersuchung, die somatische Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern, nachgewiesen hat, ist aber neu. Jüngste Untersuchungen (Newman, E. A. und Zahs, K. R., 1998) zeigen, daß Kalziumwellen im Astroglia-synzytium die Übertragungseffizienz neuronaler Verbindungen erhöhen können.

5.1.2 kalziumsignale im Ausläufer

Der Nachweis von Kalziumreaktionen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern in Bergmann Gliazellausläufern ist das erste Mal in Grosche, et al., 1999 gelungen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine spezielle Methode zur Auswertung von Kalziumimagingdaten entwickelt, die zum Ziel hat, das zeitliche und räumliche

Verhalten von Kalziumantworten in den langgestreckten Ausläufern geeignet zu visualisieren. Wie oben schon diskutiert lassen sich die Kalziumtransienten im Ausläufer, anders als die somatischen Reaktionen, schon mit einer verhältnismäßig schwachen Stimulation auslösen. Unter diesen Bedingungen lassen sich keine Kalziumwellen erkennen. Auch bei einer Steigerung der Reizstärke (durch mehr Repetitionen) ändert sich diese Beobachtung nicht.

Auf Grund der zahlreichen Daten über Kalziumwellen in Astrogliazellen aus der Literatur (Newman, E. A. und Zahs, K. R., 1997; Simpson, P. et al., 1998) wird die These formuliert, daß eine Kalziumwelle im Zellausläufer startet und in das Soma hinaufläuft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Abschnitt der zeitliche Verlauf der im Ausläufer gemessenen Kalziumsignale mit Hilfe der sogenannten Raum-Zeit-Bilder untersucht. Aus den Ergebnissen wird die Wanderung einer Kalziumwelle vom Ausläufer in das Soma nicht ersichtlich. Allerdings begrenzen technische Limitationen, nämlich die Sättigung des Photomultipliers im proximalen Bereich des Ausläufers die Aussagekraft. Verbesserte Färbetechniken können in Zukunft dieses Problem überwinden und die Fragestellung einer neuen Untersuchung zugänglich machen. Es ist möglich, transgene Tiere zu erzeugen, die einen Kalziumindikator zelltypspezifisch exprimieren (Miyawaki, et al., 1997). Einen weiteren Hinweis gibt das zeitliche Verhalten der somatischen Kalziumantworten. Sollte eine Kalziumwelle vom Ausläufer in das Soma hineinwandern, dann wäre eine Verzögerung des Signals im Soma zu erwarten. Die Untersuchungen an den somatischen Kalziumantworten zeigen jedoch keine Verzögerung des Signals, das die Hypothese unterstützen würde. Im Gegenteil tritt die somatische Reaktion auf elektrische Stimulation hin sofort ein (s. Abschnitt). Allerdings sind die Daten nur begrenzt vergleichbar, da das Stimulationsprotokoll, das für Messungen am Soma verwendet wurde, nicht dem entspricht, das für die Messungen am Ausläufer eingesetzt wurde. Die These, daß Kalziumwellen den Ausläufer hinauf in das Soma hineinwandern, kann nicht abschließend verneint werden.

In der Literatur wurde von Grosche (Grosche, et al., 1999) für die Ausläufer der Bergmann Gliazellen das Konzept der Mikrodomänen eingeführt. Mikrodomänen sind der Definition nach vom Zellkörper diffusionsunabhängige, funktionelle Regionen der Zelle, die zeitlich und räumlich begrenzt auf ihre Umgebung reagieren

können. Morphologisch entsprechen sie den „leave-like-structures“, die aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Palay und Chan-Palay (Chan-Palay, V. und Palay, S. L., 1987) bekannt sind. Mikrodomänen messen ca. 15 μM in allen drei Achsen. Die Raum-Zeit-Bilder, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, weisen darauf hin, daß zumindest bei einzelnen elektrischen Stimulationspulsen die Kalziumerhöhungen auf Bereiche des Ausläufers beschränkt bleiben, die den Mikrodomänen in ihrer Größe entsprechen. Erst wenn mit Hilfe einer größeren Stimulationspipette global stimuliert wird, zeigt der Zellkörper ebenfalls Kalziumantworten.

Die Vorstellung von einer lokalen Begrenzung von Kalziumsignalen in den Ausläufern auf Bereiche in der Größe einer Mikrodomäne wird von den Ergebnissen von Takechi (Takechi, et al., 1998) unterstützt. In dieser Veröffentlichung wird mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie gezeigt, daß Teile von Dendritenbäumen von Purkinjezellen mit lokalen Kalziumtransienten auf elektrische Stimulation der Parallelfasern antworten. Die räumliche Ausdehnung dieser Signale entspricht denen der Mikrodomänen.

Eine erhöhte Kalziumkonzentration in Zytosol hat einen negativen Einfluß auf die Leitfähigkeit der Gap-Junctions, die Astrogliazellen zu einem Synzytium verbinden (Giaume, C. und McCarthy, K. D., 1996; Müller, et al., 1996). Die Funktion der Gap-Junctions zwischen Astrogliazellen ist wichtig für die Erhaltung neuronaler Aktivität. Hohe Kaliumkonzentrationen im Extrazellulärraum, die bei neuronaler Aktivität entstehen, werden durch Astroglia (Kuffler, S. et al., 1966) bzw. durch Bergmann Gliazellen gepuffert (Siegel, et al., 1991). Astrogliazellen nehmen extrazelluläres Kalium durch plasmamembranständige Kaliumkanäle auf und leiten es mit Hilfe der Gap-Junctions intrazellulär an die umgebenen Astrogliazellen weiter. Dieser Mechanismus stellt eine extrazellulär homogene Kaliumkonzentration sicher. Die verminderte Leitfähigkeit von Gap-Junctions bzw. die reduzierte Fähigkeit Kalium abzuführen, stellt einen schnellen, auf eine Mikrodomäne eingeschränkten „feed-back“-Mechanismus von Astrogliazellen auf neuronale Erregbarkeit dar. Auf diese Weise kann eine regionale Kopplung von Synapsen erreicht werden.

5.2 Pharmakologische Charakterisierung der Kalziumsignale

Es sind zahlreiche Untersuchungen zu Kalziumagonisten für Gliazellen (Verkhratsky, A. und Kettenmann, H., 1996) und Bergmann Gliazellen (Kirischuk, et al., 1996; Tuschick, S., 1997; Tuschick, et al., 1997) veröffentlicht worden. In diesen Arbeiten wurde eine reiche Ausstattung an Rezeptoren auf Gliazellen nachgewiesen, deren Aktivierung zu Kalziumsignalen führt. In dieser Arbeit haben wir uns auf die Untersuchung von Neurotransmittern als mögliche Auslöser für die von elektrischer Stimulation hervorgerufenen Kalziumsignale beschränkt. Eine vollständige Untersuchung aller im Kleinhirn gefundenen Neurotransmitter in Bezug auf ihre Fähigkeit, Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen hervorzurufen, liegt mit der Dissertation von Sebastian Tuschik (Tuschick, S., 1997) vor. Die in Frage kommenden Transmitter sind demnach Glutamat, Histamin, Adrenalin, Noradrenalin, Adenosin-tri-Phosphat (ATP) und Endothelin (in allen drei bekannten Isoformen). Bis auf Glutamat wirken alle Transmitter auf metabotrope Rezeptoren, d.h. sie sind abhängig vom endoplasmatischen Retikulum als Kalziumquelle. In der vorliegenden Arbeit wurden für jeden der oben genannten Transmitter zwei Vorgehensweisen verfolgt, um seine Beteiligung an den beobachteten Signalen zu untersuchen. Ein genereller Ansatz blockiert jeden G-Protein gekoppelten Rezeptor, der über den PLC-IP₃ Weg (s. unten) Kalziumreaktionen hervorruft. Dazu wird mit Hilfe von Thapsigargin und wiederholter Applikation von ATP das Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum entfernt. Der zweite Ansatz verfolgt die Möglichkeit, spezifische Blocker gegen die einzelnen Transmitterrezeptoren zu applizieren. Im folgenden soll diskutiert werden, welchen Anteil die metabotropen Rezeptoren, die auf Bergmann Gliazellen bislang nachgewiesen werden konnten, an den Kalziumantworten dieser Zellen auf elektrische Stimulation der Parallelfasern haben.

5.2.1 Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums

Das endoplasmatische Retikulum spielt in der Kalziumhomöostase eine wichtige Rolle. Zum einen sorgt es im Ruhezustand der Zelle durch die SERCA-Pumpe für ein gleichbleibend niedriges Kalziumniveau im Zytosol. Zum anderen kann es durch Öffnen von IP₃-Rezeptoren (resp. Ryanodinrezeptoren in Neuronen) für schnelle Kalziumtransienten sorgen. Durch Sore Operated Calcium Channels (SOCC) können schnelle, kurzzeitige Kalziumantworten aus dem endoplasmatischen

Retikulum durch lang anhaltende (im Bereich von mehreren Minuten) Plateauphasen erweitert werden. Kalziumkanäle vom SOCC-Typ öffnen sich gegenüber dem Extrazellulärraum, so daß die Plateauphase von extrazellulärem Kalzium abhängig ist (Hartmann, J. und Verkhratsky, A., 1998; Toescu, E. et al., 1998).

Seit der Entdeckung eines ersten Vertreters 1995 (Kirischuk, et al., 1995) sind auf der Bergmann Gliazelle zahlreiche metabotrope Rezeptoren als Quelle zytoplasmatischer Kalziumsignale nachgewiesen worden. Diese Rezeptoren aktivieren mit Hilfe von G-Proteinen die Phospholipase C (PLC), welche das membrangebundene Phospholipid Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2) hydrolysiert. Dabei entsteht Inositol 1,4,5 Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG, ein Aktivator für Proteinkinase C). IP_3 ist in der Lage, durch IP_3 -Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums zytoplasmatische Kalziumtransienten hervorzurufen (zur Übersicht: Ferris, C. D. und Snyder, S. H., 1992). In der vorliegenden Arbeit ist versucht worden, diesen Weg auszuschalten.

Thapsigargin wurde in dieser Arbeit als ein irreversibler Antagonist der SERCA-Pumpe (Thastrup, et al., 1990; Lytton, et al., 1991) eingesetzt. Es verhindert, daß nach Aktivierung der IP_3 -Rezeptoren das endoplasmatische Retikulum durch diese Pumpe wieder mit Kalzium befüllt wird. Anschließend wurden die Speicher durch mehrmalige Applikation von ATP geleert (Kirischuk, et al., 1995). In Abschnitt dieser Arbeit wird gezeigt, daß sich mit elektrischer Stimulationen auch im weiteren Verlauf Kalziumreaktionen in unverminderter Intensität hervorrufen ließen, obwohl ATP nicht mehr in der Lage war, Kalziumtransienten auszulösen. Neuere Untersuchungen weisen auf alternative, Thapsigargin insensitive Wiederbefüllungsmechanismen des endoplasmatischen Retikulums hin. In der Arbeit wurde gezeigt, daß auch eine Kontrollapplikation von ATP nach der Stimulation keine Antwort hervorruft, was gegen das Vorhandensein eines solchen Mechanismus auf Bergmann Gliazellen spricht. Das Ausbleiben der Reaktion könnte auch auf eine Desensitivierung der Rezeptoren (etwa auf Basis einer Internalisierung der Rezeptoren) zurückzuführen sein. Dem kann entgegengehalten werden, daß es ohne vorherige Applikation von Thapsigargin möglich ist, mit ATP in zahlreichen Wiederholungen auf Bergmann Gliazellen Kalziumsignale auszulösen. Voraussetzung ist, daß man den Zellen ausreichend Zeit läßt, die internen Speicher

wieder zu befüllen (ca. 10 min; Kirischuk, et al., 1995). Allein durch dieses Experiment läßt sich eine Beteiligung von Rezeptoren, die über den PLC-IP₃-Weg wirken, ausschließen.

5.2.2 Glutamatrezeptoren

Glutamat ist der exzitatorische Neurotransmitter der Körnerzellen bzw. der Parallelfasern. Glutamatrezeptoren sind damit die aussichtsreichsten Ziele für eine pharmakologische Untersuchung der Herkunft von Kalziumantworten auf elektrische Stimulation der Parallelfasern. Glutamatrezeptoren lassen sich in drei Arten gliedern. Zwei Arten von Glutamatrezeptoren sind ionotrop. Dabei handelt es sich um NMDA-Rezeptoren und um Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ. Diese Rezeptoren bilden membranständige Ionenkanäle, die nicht von zellinternen Kalziumspeichern abhängen. Die dritte Art von Glutamatrezeptoren, die metabotropen Glutamatrezeptoren, gliedern sich in drei Klassen. Die erste dieser Klassen ist an den PLC-IP₃-Mechanismus gekoppelt (Hollmann, M. und Heinemann, S., 1994). Diese Rezeptoren wurden auf Bergmann Gliazellen nachgewiesen (Lopez, Colome AM, Ortega, et al., 1997).

Im letzten Abschnitt wird auf die Glutamattransporter eingegangen. Diese Membranmoleküle sind sowohl auf der Bergmann Gliazelle als auch auf den umliegenden Neuronen exprimiert (Lehre, K. P. und Danbolt, N. C., 1998; Dehnes, et al., 1998). Sie sorgen durch die Aufnahme des ausgeschütteten Glutamats für eine Terminierung des synaptischen Signals (Lehre, K. P. und Danbolt, N. C., 1998) und üben eine neuroprotektive Wirkung aus, indem sie das in hoher Konzentration neurotoxische Glutamat einer Metabolisierung in das unwirksame Glutamin zuführen (Peng, et al., 1993; Trotti, et al., 1998).

5.2.2.1 Metabotrope Glutamatrezeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von metabotropen Glutamatrezeptoren an durch elektrische Stimulation vermittelten Kalziumsignalen auf zwei Weisen ausgeschlossen. Einerseits kann man schon aus dem oben beschriebenen Ergebnis über die Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums als Kalziumquelle einen Einfluß von metabotropen Glutamatrezeptoren ausschließen. Andererseits wurden verschiedene für die Klasse I der metabotropen

Glutamatrezeptoren spezifischen Antagonisten eingesetzt. An erster Stelle sei AIDA genannt, daß als sehr potenter Antagonist für die Klasse I metabotroper Glutamatrezeptoren gilt (Moroni, et al., 1997). Dieser Antagonist zeigt bei alleiniger Applikation eine signifikante Wirkung (s. Abschnitt 4.5.1). Allerdings konnte bei einer Applikation eines Cocktails von verschiedenen Antagonisten für metabotrope Glutamatrezeptoren (s. Abschnitt 4.5.1), in dem außer AIDA noch E4CPG und PhCCC enthalten war, (Sekiya, et al., 1996; Annoura., 1996) keine Erhöhung der Wirkung erzielt werden. Der Anteil der blockierten Reaktion ist in diesem Cocktail geringer als bei AIDA für sich allein genommen. Für diesen Effekt können verschiedene mögliche Ursachen als Erklärung angenommen werden. So z.B. ist nicht ausgeschlossen, daß AIDA eher über eine Veränderung des Brechungsindex der Lösung als über eine physiologische Reaktion wirksam erscheint. In dem Cocktail könnte diese Wirkung wieder aufgehoben sein.

5.2.2.2 Rezeptoren vom AMPA/Kainat Typ

Die Experimente, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, lassen eine Beteiligung dieser Rezeptoren an den Kalziumantworten auf elektrische Stimulation als sehr wahrscheinliche Möglichkeit erscheinen. Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ sorgen in Neuronen auf der postsynaptischen Seite für eine schnelle Depolarisierung der Membran im Falle synaptischer Aktivität (Kandel, E. et al., 1991). Der Nachweis kalziumpermeabler Rezeptoren dieses Typs auf Bergmann Gliazellen stellte 1993 (Müller, et al., 1992) eine große Sensation dar.

In dieser Arbeit wurde CNQX als spezifischer Antagonist für den AMPA/Kainat-Rezeptortyp eingesetzt. Dieser Blocker unterbindet in Konzentrationen von 20 μM zuverlässig die Wirkung von 100 μM Kainat, wenn es über die Badlösung appliziert wird (Müller, et al., 1992). Der Anteil der blockierten Reaktion von nur 23.7% ist überraschend gering, zumal CNQX gelblich gefärbt ist und daher zu einer Verminderung des Signals auf rein optischem Wege führt. Auf Grund der optischen Wirksamkeit von CNQX war es nicht möglich, die Konzentration des Blockers auf 100 μM zu erhöhen. Es erscheint möglich, daß die in dem synaptischen Spalt auftretende Glutamatkonzentration verhältnismäßig hoch ist im Vergleich zu der Konzentration des Agonisten in der optischen Meßebeine bei einer Applikation über die Badlösung. Denn anders als im Stimulationsexperiment

muß die applizierte Substanz erst in die entsprechende Tiefe des Schnittes hineindiffundieren. CNQX ist ein kompetitiver Blocker (Hollmann, M. und Heinemann, S., 1994), so daß die relativen Konzentrationen von Glutamat zu CNQX eine ausschlaggebende Rolle spielen.

5.2.2.3 Rezeptoren vom NMDA Typ

Der Einfluß von NMDA-Rezeptoren auf Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf die elektrische Stimulation der Parallelfasern ist in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Obwohl man bei der Applikation von NMDA auf einen Kleinhirnschnitt durchaus Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen nachweisen kann, sprechen die im folgenden kurz skizzierten Ergebnisse von Shao für einen indirekten Effekt (Shao, Y. und McCarthy, K. D., 1997). NMDA ist in der Lage, Körnerzellen zu aktivieren und somit Glutamat (oder den Kotransmitter ATP) in der Molekularschicht freizusetzen. In der Kleinhirnschnittpräparation ist es möglich, NMDA vermittelte Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen durch TTX zu inhibieren. Aktionspotentialweiterleitung ist also essentiell für Kalziumreaktionen in Bergmann Gliazellen bei NMDA-Gabe. Dieses System eröffnet eine weitere Möglichkeit, Neuron-Glia-Interaktionen auf physiologischer Ebene im Modell der Bergmann Gliazelle zu untersuchen. Der Vorteil ist, daß die Zellen zu einem größeren Anteil reagieren als bei der elektrischen Stimulation, da die Reaktion nicht von der passenden Plazierung der Stimulationselektrode abhängt. Der Nachteil liegt darin, daß sich diese Methode einer auf den NMDA-Rezeptor zugeschnittenen, pharmakologischen Vorgehensweise verschließt. Da die direkte Wirkung (in Gegenwart von TTX) von NMDA auf Bergmann Gliazellen nur elektrophysiologisch (Müller, et al., 1993) nicht aber im Kalziumimaging meßbar ist, wiegt dieser Nachteil für Kalziummessungen nicht schwer. In dem später folgenden Ausblick über „Long Term Depression“ (LTD) und Bergmann Gliazellen wird die Hypothese aufgestellt, daß postsynaptische NMDA Rezeptoren auf den Purkinjoneuronen in Verbindung mit einem retrograden Botenstoff indirekt für Kalziumsignale in der Bergmann Gliazelle verantwortlich sind. Für die Untersuchung dieser Fragestellung ist das in dieser Arbeit etablierte System der elektrischen Stimulation zu Aktivierung der Parallelfasern der Gabe von NMDA überlegen.

5.2.2.4 Glutamattransporter

In dieser Arbeit konnte ein Einfluß von Glutamattransportern auf die durch elektrische Stimulation vermittelten Kalziumantworten von Bergmann Gliazellen nicht nachgewiesen werden. Glutamattransporter auf Bergmann Gliazellen sind wichtig für die Terminierung synaptischer Aktivität und um neurotoxische Effekte von Glutamat zu unterbinden (Lehre, K. P. und Danbolt, N. C., 1998). Der Transporter ist energieabhängig. Die Energie wird über den Kotransport von Glutamat mit drei Natriumionen und einem Proton gewonnen (Vandenberg, R. J., 1998). Aber auch Kalzium kann auf diese Weise durch den Glutamattransporter in die Zelle eindringen. Eine andere Möglichkeit beachtet den Umstand, daß Natrium durch den Glutamattransporter in die Zelle einströmt. In hohen intrazellulären Konzentrationen kann Natrium zu einer Umkehrung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führen und so einen signifikanten Kalziumeinstrom hervorrufen (Kirischuk, et al., 1997).

Clark und Babour konnten in ihren Experimenten zeigen, daß die Stimulation der Parallelfasern zu einer Membrandepolarisation führt, die zum Teil auf den Glutamattransporter zurückgeht (Clark, B. A. und Barbour, B., 1997). Der von Clark und Babour gemessene Effekt ließ sich zum größten Teil durch I-PDC, einem Glutamattransporter Antagonisten, blockieren. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit ergibt sich eine Reduktion des Signals um ca. 25%, wenn nur I-PDC ohne weitere Substanzen appliziert wird (Abschnitt 5.5.2). Man kann diesen Effekt auf die Blockade der beiden oben beschriebenen Mechanismen zurückführen.

Im Widerspruch zu diesem Ergebnis stehen die Daten, die in dieser Arbeit in Verbindung mit der Blockierung der SERCA Pumpe, also bei entleerten Kalziumspeichern des endoplasmatischen Retikulums, gewonnen wurden (Abschnitt). In diesem Fall führt eine Blockade des Austauschers durch I-PDC zu einer deutlichen Erhöhung des Signals. Dieser Effekt läßt sich durch die Anreicherung von Glutamat im Extrazellulärraum erklären. Das Glutamat wird nicht mehr in die Zellen aufgenommen, also wird das Signal größer. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, zu erkunden, wie die Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums auf die Glutamattransporter wirken.

5.2.3 Purinozeptoren

In den Ergebnissen aus dieser Arbeit ist ein Einfluß von metabotropen Purinozeptoren auf Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen als Antwort auf elektrische Stimulation nicht nachweisbar. Wie im folgenden dargestellt wird, ist ATP neben Glutamat als Kotransmitter in den synaptischen Endigungen der Parallelfasern ein wichtiger Kandidat für die Vermittlung von neuronaler Aktivität.

ATP ist hauptsächlich aufgrund seiner wichtigen Funktion als intrazellulärer Energieträger im Energiestoffwechsel der Zellen bekannt. Eine mögliche Rolle als Transmitter wurde zwar schon in den 50er Jahren beschrieben, jedoch dauerte es bis in die 80er Jahre, bis ATP und seinen Rezeptoren eine größere Aufmerksamkeit der Physiologen widerfuhr (zur Übersicht: Dalziel, H. H. und Westfall, D. P., 1994). Zu Beginn der 90er Jahre wurde die Rolle von ATP als Neurotransmitter etabliert (Stone, T. W., 1981; Burnstock, G., 1990; Evans, R. et al., 1992; Edwards, F. et al., 1992; zu Übersicht: Zimmermann, H., 1994). Die Rezeptoren von ATP (P_2) bilden zusammen mit den Rezeptoren von Adenosin (P_1) die Gruppe der Purinozeptoren (Burnstock, G. und Kennedy, C., 1985). Die ATP-Rezeptoren werden aufgrund ihrer Gewebsverteilung und unterschiedlicher Sensitivität für verschiedene Agonisten weiter in P_{2T} , P_{2U} , P_{2X} P_{2Y} und P_{2Z} -Rezeptoren unterteilt. Die P_{2T} , P_{2U} und P_{2X} -Rezeptoren sind Ionenkanal-gekoppelt, während die P_{2Y} und P_{2U} -Rezeptoren G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind (zur Übersicht: Fredholm, B. et al., 1994).

Der Nachweis von ATP-Rezeptoren auf Astrozyten gelang erstmals Salter und Hicks (Salter, M. W. und Hicks, J. L., 1994). Metabotrope Purinorezeptoren auf der Bergmann Gliazelle wurden das erste Mal 1996 von S. Kirischuk nachgewiesen (Kirischuk, et al., 1996). In der gleichen Arbeit wird gezeigt, daß ionotrope Purinorezeptoren auf diesen Zellen nicht vorkommen.

Das Experiment, das wie bereits beschrieben, die Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums unter zur Hilfenahme von Thapsigargin entleert, macht deutlich, daß eine Beteiligung metabotroper Purinozeptoren unwahrscheinlich ist. Der P_2 -spezifische Antagonist PPADS (Charlton, S. et al., 1996) und der unspezifische Blocker Evans Blue (Whittenburg., 1996), die in dieser Arbeit untersucht wurden, hatten beide aufgrund ihrer starken roten bzw. blauen Färbung starke, optische Effekte und ließen sich nicht auswerten. Die entsprechenden

Abbildungen sind daher nicht in den Ergebnisteil dieser Arbeit eingegangen. Vertiefende Untersuchungen können in Zukunft mit Hilfe anderer, optisch inaktiver Blocker das Ergebnis für P₂-Rezeptoren untermauern.

5.2.4 Histaminerge Signale

In der vorliegenden Arbeit ist ein Einfluß von G-Protein gekoppelten Histaminrezeptoren auf Kalziumsignale in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation untersucht worden. Histamin, ein biogenes Amin, wirkt im ZNS als Neurotransmitter: Die Somata der histaminergen Neurone liegen ausschließlich im Corpus mamillare des Hypothalamus. Ihre Fasern projizieren nahezu in alle Gehirnregionen, vorwiegend an Varikositäten, aber kaum aus den für Neurone typischen präsynaptischen Strukturen. Eine gemeinsame Freisetzung mit anderen Transmittern, wie GABA und ATP wird angenommen (zur Übersicht: Wada, et al., 1991). Als weitere, nicht neuronale Histaminquelle im Gehirn wurden Mastzellen beschrieben, deren Einfluß auf Gehirnfunktionen aber umstritten ist (zur Übersicht: Schwartz, J. et al., 1991).

Histaminerge Effekte werden durch die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Histamin-Rezeptoren vermittelt. Es sind drei Rezeptortypen bekannt (H₁, H₂ und H₃, zur Übersicht: Haaksma, E. et al., 1990; Arrang, J. M., 1994), die alle auch im Gehirn exprimiert werden. Aufgrund dieser allgemeinen Präsenz histaminerger Signale im ZNS wird angenommen, daß Histamin übergreifende Hirnfunktionen beeinflusst, darunter den inneren Erregungszustand, die Thermoregulation, lokomotorische Aktivität und den Energieumsatz (zur Übersicht: Wada, et al., 1991; Wada, et al., 1991; Wada, et al., 1991).

Aus der Arbeit von Kirischuk et al. (Kirischuk, et al., 1996) ist bekannt, daß durch Histamin rezeptorvermittelte Kalziumtransienten auf Bergmann Gliazellen ausgelöst werden können. Mit pharmakologischen Mitteln wurden H₁-Histaminrezeptoren als ausschlaggebend für diese Signale charakterisiert. Die Kalziumtransienten werden dabei durch die Aktivierung IP₃-sensitiver Rezeptorkanäle der Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums hervorgerufen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Rolle der H₁-Histaminrezeptoren bei der Generierung von Kalziumtransienten durch elektrische Stimulation der Parallelfasern einzukreisen. Da weder die irreversible Entleerung der

Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums (Abschnitt 4.3) noch ein spezifischer Blocker (Abschnitt 4.4.3) für histaminerge Rezeptoren zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Antworten führte, kann man davon ausgehen, daß die H₁-Rezeptoren nicht für die Vermittlung dieses Signals verantwortlich sind. Dieses Ergebnis verträgt sich mit der Vorstellung speziell die glutamatergen Parallelfasern zu stimulieren. Die Funktion der Histamin-vermittelten Kalziumtransienten bleibt damit weiter ungeklärt.

5.2.5 Endothelinrezeptoren

Ein Einfluß von Endothelinrezeptoren auf Kalziumantworten in Bergmann Gliazellen auf elektrische Stimulation konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Endothelin wurde zunächst als vasoaktives Peptid beschrieben, das in den Endothelzellen der Blutgefäße synthetisiert wird (Yanagisawa, et al., 1988). Endothelin gilt als der stärkste bekannte Vasokonstriktor, dessen blutdrucksteigernde Wirkung auf einer Erhöhung des Tonus in der glatten Muskulatur der Gefäßwände beruht. Von Endothelin sind drei Isoformen bekannt: ET-1, ET-2 und ET-3 (Inoue, et al., 1989). Diese werden jeweils von einem eigenen Gen codiert und sind eng verwandt mit den kardiotoxischen Sarafotoxinen S6a, S6b, S6c und S6d aus dem Gift der Natter *Atractapsis engaddensis* (zur Übersicht: Kloog, Y. und Sokolovsky, M., 1989).

Für jede Endothelin-Isoform bildet ein vergleichsweise großes Vorläuferpeptid ‚prepro-ET‘ den Beginn des Biosyntheseweges. Das Peptid wird zu einer Zwischenform, dem ‚big-ET‘ gespalten, das seinerseits durch ein ‚endothelin converting enzyme‘ (ECE) durch Hydrolyse in die aktive Form überführt wird. (zur Übersicht: Turner, A. J. und Murphy, L. J., 1996). Es wurden zwei membrangebundene ECE-Isoformen identifiziert: ECE-1 (Xu, et al., 1994) ist in der Lage sowohl intra- als auch extrazelluläres ‚big-ET‘ zu spalten, während ECE-2 (Emoto, N. und Yanagisawa, M., 1995) vermutlich im Lumen von trans-Golgi Vesikeln aktiv ist. Obwohl bisher nur ‚big-ET‘ als Substrat der ECE-Isoformen nachgewiesen wurde, werden weitere Funktionen dieser Enzyme nicht ausgeschlossen (zur Übersicht: Turner, A. J. und Murphy, L. J., 1996).

Die drei bekannten Endothelinrezeptoren sind alle G-Protein gekoppelt (zur Übersicht: Huggins, J. et al., 1993): ET_A (Arai, et al., 1990), ET_B (Sakurai, et al.,

1990) und ET_C (Karne, et al., 1993), letzterer wurde bisher nicht in Säugetieren gefunden. Die Klassifizierung der Endothelin-Isoformen beruht auf ihren Affinitäten für die Endothelin-Isoformen (Masaki, et al., 1994): Der ET_A-Rezeptor bindet ET-1 stärker als ET-3, der ET_B-Rezeptor bindet alle Endothelin-Isoformen mit gleicher Affinität und der ET_C-Rezeptor bindet ET-3 stärker als ET-1.

Trotz ihrer starken Vasoaktivität sind Endothelin-Signale nicht auf das Kreislaufsystem beschränkt: Endothelin-Biosynthese, Endothelin-Bindung und Endothelin-Rezeptorexpression wurde in allen Organen inklusive dem ZNS gezeigt (zur Übersicht: Rubanyi, G. M. und Polokoff, M. A., 1994).

Tuschik und Kirischuk konnten durch Einzelzell RT-PCR Analyse und auf pharmakologischem Wege ET_B-Rezeptoren auf Bergmann Gliazellen nachweisen. Im Unterschied zu anderen Kalziumagonisten für Bergmann Gliazellen desensitivieren Endothelin vermittelte Antworten nachhaltig. Als wahrscheinlichste Ursache für die Desensitivierung wird die Internalisierung des Rezeptors diskutiert. In dieser Arbeit wurde die Desensitivierung genutzt, um die Beteiligung des ET_B-Rezeptors an Kalziumsignalen in Verbindung mit elektrischer Stimulation der Parallelfasern auszuschließen. Es gibt zwei Schlußfolgerungen, die eine Rolle der Endothelin-Rezeptoren an diesen Signalen ausschließen. Da weder eine irreversible Entleerung der Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums (Abschnitt 4.3) noch ein Zusammenspiel eines Agonisten (um die Internalisierung der Rezeptoren auszulösen) und eines Antagonisten für ET_B-Rezeptoren zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Antworten führte (Abschnitt 4.4.5), kann man davon ausgehen, daß diese Rezeptoren nicht für die Vermittlung des Signals verantwortlich sind. Dieses Ergebnis paßt sehr gut zu der Idee, speziell die glutamatergen Parallelfasern zu stimulieren. Die Funktion der Endothelin vermittelten Kalziumtransienten bleibt damit weiter ungeklärt.

5.3 Ausblick: Bergmann Gliazellen und Long Term Depression

Neben dem Phänomen der Long-Term-Potentiation (LTP), das im Hippocampus intensiv studiert wurde, ist die Long-Term-Depression (LTD) in der Molekuarschicht des Kleinhirns ein zweites gut untersuchtes System, in dem Lernen und Gedächtnis mit der Effizienzsteigerung einzelner Synapsen in Verbindung gebracht wird. Beide Vorgänge sind bis in die molekulare Ebene hinein erforscht. Die Ergebnisse dieser

Arbeit lassen die Rolle der Bergmann Gliazellen als weniger passiv erscheinen, als bisher angenommen wurde. Eine Beteiligung an LTD kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Schlüsselrolle in diesem Vorgang nimmt der NMDA-Rezeptor durch die bislang nur an diesem Rezeptor beobachteten Eigenschaft, sowohl durch die Membranspannung, als auch durch einen Liganden gesteuert zu sein. Nur wenn es zu einer deutlichen Depolarisation des postsynaptischen Neurons, wie sie im Falle paralleler Aktivität mehrerer benachbarter Synapsen auftritt, und wenn außerdem der Ligand Glutamat an den Rezeptor bindet, dann entweicht ein Magnesiumion aus der Pore, das den Kanal in Abwesenheit einer der beiden Faktoren undurchlässig macht (Hollmann, M. und Heinemann, S., 1994). Durch den Kanal kann Natrium und Kalzium in die Zelle einstömen (Burnashev, et al., 1995). Eine spezifische Blockade des NMDA-Rezeptors durch APV inhibiert LTP zuverlässig (Zhou, et al., 1997).

Zukünftige Untersuchungen können eine Verbindung zwischen Kalziumtransienten in der Bergmann Gliazelle und LTD aufdecken. Da in dieser Arbeit kein Signalweg gefunden wurde, der einen bekannten Neurotransmitter einschließt und die Kalziumsignale blockieren konnte, ist es nicht auszuschließen, daß ein retrograder Botenstoff von der postsynaptischen Purkinjezelle ausgeht (wie z.B. NO) und einen Kalziumeinstrom (Malcolm, et al., 1996) in die Bergmann Gliazelle hervorruft. Wie in Newman, E. A. und Zahs, K. R., 1998 gezeigt wurde, sind Kalziumsignale in Astrogliazellen hinreichend, um die synaptische Übertragungseffizienz zu steigern.

6 Zusammenfassung

Bergmann Gliazellen reagieren auf elektrische Stimulation der Parallelfasern in Ihrem Soma Kalziumsignalen. Diese Signale sind sensitiv gegenüber den Antagonisten TTX, kalziumfreie Lösung und Cadmium, die neuronale Aktivität blockieren. Ein Antagonist spannungaktivierter Kaliumkanäle, der synaptische Ereignisse verlängert, führt zu erheblich verstärkten Antworten. Bergmann Gliazellen können synaptische Aktivität durch somatische Kalziumkanäle detektieren.

Um Kalziumantworten in Bergmann Gliazellsomata auszulösen ist eine erheblich stärkere elektrische Stimulation notwendig, als man für Kalziumantworten im Ausläufer der Zellen benötigt. Um Kalziumsignale im Soma der Zelle zu erreichen, muß man mit mindestens zehn Pulse geben mit einer relativ niederohmigen Stimulationspipette geben, während im Ausläufer schon ein einziger Puls mit einer höher ohmigen Pipette genügt. Die Ausläufer der Bergmann Gliazellen sind empfindlicher gegenüber neuronaler Aktivität, als die Zellsomata.

Es wurde eine Methode entwickelt, Raum-Zeit-Bilder von Kalziumantworten in Bergmann Gliazellausläufern auf elektrische Stimulation zu erzeugen. Die Darstellungen zeigen zeitlich und räumlich eingeschränkte Reaktionen auf teilen der Ausläufer. Beispiele für das Fortschreiten einer Kalziumwelle vom Ausläufer in das Zellsoma (oder umgekehrt) ließen sich nicht finden. Die räumlich Ausdehnung der beobachteten Signale unterstützt das in Grosche et al. (Grosche, et al., 1999) entwickelte Konzept von Mikrodomänen in Bergmann Gliazellausläufern.

Die gemessenen Kalziumsignale sind nicht von den Kalziumspeichern des endoplasmatischen Retikulums abhängig. Dies schließt die Beteiligung G-Protein gekoppelter Rezeptoren, die unter Aktivierung von endoplasmatischen IP₃-Rezeptoren zu zytosolischen Kalziumsignalen führen, an der Generierung diese Signale aus.

Die Beteiligung der Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Endothelin, Adenosin-tri-Phosphat und des Neurotransmitters Glutamat auf dem Wege der Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren an der Detektion stimulationsvermittelter Kalziumsignale wurde über die Applikation spezifischer Antagonisten ausgeschlossen. Darüber hinaus kann man Ihren Einfluß ausschließen,

da sie zytosolische Kalziumsignale über die Aktivierung endoplasmatischer IP₃-Rezeptoren erzeugen.

Die Rolle von Glutamattransportern konnte nicht abschließend geklärt werden, da der Antagonist bei einer alleinigen Applikation zu einer Reduktion des Signals um 20 % führt. Bei einer Applikation mit geleertem endoplasmatischen Retikulum führt er zu einer Steigerung der Signalamplitude um 31.9 %.

Die somatischen Kalziumantworten auf elektrische Stimulation ließen sich zu einem Prozentsatz von 23.7 % durch den Antagonisten CNQX für ionotrope Glutamatrezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ blockieren. In Bergmann Gliazellen sind diese Rezeptoren anders als in Neuronen kalziumpermeabel (Müller, et al., 1992), da diese Zelle nicht die Untereinheit GluR2 des Kanals exprimieren. Es wurde eine funktionelle Bedeutung dieser Genexpression in der Detektion synaptischer Aktivität nachgewiesen.

7 Literaturverzeichnis

- Altman, J. und Bayer, S. A., 1997: Altman, J. and Bayer, S. A. (1997) Development of the Cerebellar System. Boca Raton, CRC Press.
- Annoura., 1996: Annoura. (1996) A novel class of antagonists for metabotropic glutamate receptors, 7-(hydroxyimino)cyclopropa[b]chromen-1a-carboxylates. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **6**, 763.
- Arai, et al., 1990: Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor [see comments]. *Nature* **348** (6303), 730-732.
- Arrang, J. M., 1994: Arrang, J. M. (1994) Pharmacological properties of histamine receptor subtypes. *Cell Mol.Biol.Noisy.le.grand.* **40** (3), 275-281.
- Babb, T. et al., 1998: Babb, T. L., Ying, Z., Hadam, J., and Penrod, C. (1998) Glutamate receptor mechanisms in human epileptic dysplastic cortex. *Epilepsy Res.* **32** (1-2), 24-33.
- Barres, B. A., 1991: Barres, B. A. (1991) New roles for glia. *J.Neurosci.* **11** (12), 3685-3694.
- Bevan, S., 1990: Bevan, S. (1990) Ion channels and neurotransmitter receptors in glia. *Semin.Neurosci.* **13**, 441-474.
- Budd, S. L., 1998: Budd, S. L. (1998) Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol.Ther.* **80** (2), 203-229.
- Burnashev, et al., 1992: Burnashev, N., Khodorova, A., Jonas, P., Helm, P. J., Wisden, W., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1992) Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* **256** (5063), 1566-1570.
- Burnashev, et al., 1995: Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., and Sakmann, B. (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J.Physiol.Lond.* **485** (Pt 2), 403-418.
- Burnstock, G., 1990: Burnstock, G. (1990) Overview. Purinergic mechanisms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **603**, 1-17.
- Burnstock, G. und Kennedy, C., 1985: Burnstock, G. and Kennedy, C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen.Pharmacol.* **16** (5), 433-440.
- Cameron, Curry P. und Le, Douarin NM., 1995: Cameron, Curry P. and Le, Douarin NM. (1995) Oligodendrocyte precursors originate from both the dorsal and the ventral parts of the spinal cord. *Neuron* **15** (6), 1299-1310.
- Catts, S. et al., 1997: Catts, S. V., Ward, P. B., Lloyd, A., Huang, X. F., Dixon, G., Chahl, L., Harper, C., and Wakefield, D. (1997) Molecular biological investigations into the role of the NMDA receptor in the pathophysiology of schizophrenia. *Aust.N.Z.J.Psychiatry* **31** (1), 17-26.
- Chan-Palay, V. und Palay, S. L., 1972: Chan-Palay, V. and Palay, S. L. (1972) The form of velate astrocytes in the cerebellar cortex of monkey and rat: high voltage electron microscopy of rapid Goli preparations. *Z.Anat.Entwickl.-Gesch.* **138**, 1-19.

- Chan-Palay, V. und Palay, S. L., 1987: Chan-Palay, V. and Palay, S. L. (1987) *Cerebellum*. Boston, Birkhäuser.
- Chan-Palay, V. und Palay, S. L., 1987: Chan-Palay, V. and Palay, S. L. (1987) *Cerebellum*. Boston, Birkhäuser.
- Charlton, S. et al., 1996: Charlton, S. J., Brown, C. A., Weisman, G. A., Turner, J. T., Erb, L., and Boarder, M. R. (1996) PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoreceptors. *Br.J.Pharmacol.* **118** (3), 704-710.
- Choi, D. W., 1988: Choi, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1** (8), 623-634.
- Clapham, D. E., 1995: Clapham, D. E. (1995) Calcium signaling. *Cell* **80** (2), 259-268.
- Clark, B. A. und Barbour, B., 1997: Clark, B. A. and Barbour, B. (1997) Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J.Physiol.Lond.* **502** (Pt 2), 335-350.
- Clark, B. A. und Barbour, B., 1997: Clark, B. A. and Barbour, B. (1997) Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J.Physiol.Lond.* **502** (Pt 2), 335-350.
- Cline, H. T. und Constantine, Paton M., 1989: Cline, H. T. and Constantine, Paton M. (1989) NMDA receptor antagonists disrupt the retinotectal topographic map. *Neuron* **3** (4), 413-426.
- Colquhoun, et al., 1992: Colquhoun, D., Jonas, P., and Sakmann, B. (1992) Action of brief pulses of glutamate on AMPA/kainate receptors in patches from different neurones of rat hippocampal slices. *J.Physiol.Lond.* **458**, 261-287.
- Constantine, Paton M., 1994: Constantine, Paton M. (1994) Effects of NMDA receptor antagonists on the developing brain. *Psychopharmacol.Bull.* **30** (4), 561-565.
- Dalziel, H. H. und Westfall, D. P., 1994: Dalziel, H. H. and Westfall, D. P. (1994) Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol.Rev.* **46** (4), 449-466.
- Daniel, et al., 1998: Daniel, H., Levenes, C., and Crepel, F. (1998) Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends.Neurosci.* **21** (9), 401-407.
- Das, G. D., 1976: Das, G. D. (1976) Differentiation of Bergmann glia cells in the cerebellum: a golgi study. *Brain Res.* **110** (2), 199-213.
- Dawson, T. M. und Snyder, S. H., 1994: Dawson, T. M. and Snyder, S. H. (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J.Neurosci.* **14** (9), 5147-5159.
- Day, N. et al., 1995: Day, N. C., Williams, T. L., Ince, P. G., Kamboj, R. K., Lodge, D., and Shaw, P. J. (1995) Distribution of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the human hippocampus and cerebellum. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **31** (1-2), 17-32.
- Dehnes, et al., 1998: Dehnes, Y., Chaudhry, F. A., Ullensvang, K., Lehre, K. P., Storm, Mathisen J., and Danbolt, N. C. (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells:

- a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J.Neurosci.* **18** (10), 3606-3619.
- Dermietzel, R. und Spray, D. C., 1993: Dermietzel, R. and Spray, D. C. (1993) Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends.Neurosci.* **16** (5), 186-192.
- Dragunow, M., 1996: Dragunow, M. (1996) A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav.Genet.* **26** (3), 293-299.
- Dudel, et al., 1988: Dudel, J., Franke, C., Hatt, H., Ramsey, R. L., and Usherwood, P. N. (1988) Rapid activation and desensitization by glutamate of excitatory, cation-selective channels in locust muscle. *Neurosci.Lett.* **88** (1), 33-38.
- Duus, P., 1995: Duus, P. (1995) *Kleinhirn (Zerebellum)*. **6** (4), 225-244. Stuttgart, Thieme.
- Edwards, F. et al., 1992: Edwards, F. A., Gibb, A. J., and Colquhoun, D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system [see comments]. *Nature* **359** (6391), 144-147.
- Edwards, F. et al., 1989: Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., and Takahashi, T. (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* **414** (5), 600-612.
- Eisenbarth, G. et al., 1979: Eisenbarth, G. S., Walsh, F. S., and Nirenberg, M. (1979) Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76** (10), 4913-4917.
- Emoto, N. und Yanagisawa, M., 1995: Emoto, N. and Yanagisawa, M. (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J.Biol.Chem.* **270** (25), 15262-15268.
- Evans, R. et al., 1992: Evans, R. J., Derkach, V., and Surprenant, A. (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* **357** (6378), 503-505.
- Fananas, J. und Ramón y Cajal., 1916: Fananas, J. and Ramón y Cajal. (1916) Contribución al estudio de la neuroglia del cerebelo. *Trab.Lab.Inv.Biol.* **14**, 163-179.
- Ferris, C. D. und Snyder, S. H., 1992: Ferris, C. D. and Snyder, S. H. (1992) Inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annu.Rev.Physiol.* **54**, 469-488.
- Finkbeiner, S. M., 1993: Finkbeiner, S. M. (1993) Glial calcium. *Glia* **9** (2), 83-104.
- Fredholm, B. et al., 1994: Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P., and Williams, M. (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol.Rev.* **46** (2), 143-156.
- Garthwaite, J. und Boulton, C. L., 1995: Garthwaite, J. and Boulton, C. L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu.Rev.Physiol.* **57**, 683-706.
- Geiger, J. et al., 1995: Geiger, J. R., Melcher, T., Koh, D. S., Sakmann, B., Seeburg, P. H., Jonas, P., and Monyer, H. (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* **15** (1), 193-204.

- Giaume, C. und McCarthy, K. D., 1996: Giaume, C. and McCarthy, K. D. (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends.Neurosci.* **19** (8), 319-325.
- Golgi, C., 1885: Golgi, C. (1885) Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso VII. tessuto interstiziale degli organi nervosi centrali (Neuroglia). *Riv.Sper.freniat.* **11**, 72-123.
- Golgi, C., 1885: Golgi, C. (1885) Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso VII. tessuto interstiziale degli organi nervosi centrali (Neuroglia). *Riv.Sper.freniat.* **11**, 72-123.
- Grosche, et al., 1999: Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., and Kettenmann, H. (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *NATURE NEUROSCIENCE* **2** (2), 139-143.
- Grosche, et al., 1999: Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., and Kettenmann, H. (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *NATURE NEUROSCIENCE* **2** (2), 139-143.
- Grynkiewicz, et al., 1985: Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *<None Specified>* **260** (6), 3440-3450.
- Haaksma, E. et al., 1990: Haaksma, E. E., Leurs, R., and Timmerman, H. (1990) Histamine receptors: subclasses and specific ligands. *Pharmacol.Ther.* **47** (1), 73-104.
- Hamill, O. P. und Sakmann, B., 1981: Hamill, O. P. and Sakmann, B. (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* **294** (5840), 462-464.
- Hanke, S. und Reichenbach, A., 1987: Hanke, S. and Reichenbach, A. (1987) Quantitative-morphometric aspects of Bergmann glial (Golgi epithelial) cell development in rats. A Golgi study. *Anat.Embryol.Berl.* **177** (2), 183-188.
- Hartmann, J. und Verkhratsky, A., 1998: Hartmann, J. and Verkhratsky, A. (1998) Relations between intracellular Ca^{2+} stores and store-operated Ca^{2+} entry in primary cultured human glioblastoma cells. *J.Physiol.Lond.* **513** (Pt 2), 411-424.
- Heinemann, et al., 1977: Heinemann, U., Lux, H. D., and Gutnick, M. J. (1977) Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in cerebral cortex of the cat. *Exp.Brain Res.* **27** (3-4), 237-243.
- Heizmann, C. W. und Hunziker, W., 1991: Heizmann, C. W. and Hunziker, W. (1991) Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends.Biochem.Sci.* **16** (3), 98-103.
- Herb, et al., 1992: Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., and Seeburg, P. H. (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* **8** (4), 775-785.
- Hestrin, S., 1993: Hestrin, S. (1993) Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons. *Neuron* **11** (6), 1083-1091.
- Hildebrand, et al., 1994: Hildebrand, C., Bowe, C. M., and Remahl, I. N. (1994) Myelination and myelin sheath remodelling in normal and pathological PNS nerve fibres. *Prog.Neurobiol.* **43** (2), 85-141.

- Hildebrand, et al., 1993: Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., and Bjartmar, C. (1993) Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog.Neurobiol.* **40** (3), 319-384.
- Hollmann, et al., 1991: Hollmann, M., Hartley, M., and Heinemann, S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252** (5007), 851-853.
- Hollmann, M. und Heinemann, S., 1994: Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu.Rev.Neurosci.* **17**, 31-108.
- Hollmann, et al., 1989: Hollmann, M., O'Shea, Greenfield A., Rogers, S. W., and Heinemann, S. (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* **342** (6250), 643-648.
- Howe, J. R., 1996: Howe, J. R. (1996) Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *J.Neurophysiol.* **76** (1), 510-519.
- Huggins, J. et al., 1993: Huggins, J. P., Pelton, J. T., and Miller, R. C. (1993) The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmacol.Ther.* **59** (1), 55-123.
- Hume, R. et al., 1991: Hume, R. I., Dingledine, R., and Heinemann, S. F. (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* **253** (5023), 1028-1031.
- Inoue, et al., 1989: Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86** (8), 2863-2867.
- Jaarsma, et al., 1995: Jaarsma, D., Wenthold, R. J., and Mugnaini, E. (1995) Glutamate receptor subunits at mossy fiber-unipolar brush cell synapses: light and electron microscopic immunocytochemical study in cerebellar cortex of rat and cat. *J.Comp.Neurol.* **357** (1), 145-160.
- Jonas, P. und Spruston, N., 1994: Jonas, P. and Spruston, N. (1994) Mechanisms shaping glutamate-mediated excitatory postsynaptic currents in the CNS. *Curr.Opin.Neurobiol.* **4** (3), 366-372.
- Jung, et al., 1996: Jung, M., Sommer, I., Schachner, M., and Nave, K. A. (1996) Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J.Neurosci.* **16** (24), 7920-7929.
- Kandel, E. et al., 1991: Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (1991) Principles of neural science. **3**.
- Kano, M., 1994: Kano, M. (1994) Calcium-induced long-lasting potentiation of GABAergic currents in cerebellar Purkinje cells. *Jpn.J.Physiol.* **44 Suppl 2**, S131-S136.
- Karne, et al., 1993: Karne, S., Jayawickreme, C. K., and Lerner, M. R. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J.Biol.Chem.* **268** (25), 19126-19133.

- Kettenmann, et al., 1983: Kettenmann, H., Orkand, R. K., and Schachner, M. (1983) Coupling among identified cells in mammalian nervous system cultures. *J.Neurosci.* **3** (3), 506-516.
- Kettenmann, H. und Ransom, B. R., 1988: Kettenmann, H. and Ransom, B. R. (1988) Electrical coupling between astrocytes and between oligodendrocytes studied in mammalian cell cultures. *Glia* **1** (1), 64-73.
- Kirischuk, et al., 1997: Kirischuk, S., Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (1997) Na⁺/Ca²⁺ exchanger modulates kainate-triggered Ca²⁺ signaling in Bergmann glial cells in situ. *FASEB J.* **11** (7), 566-572.
- Kirischuk, et al., 1996: Kirischuk, S., Matias, V., Kulik, A., Voitenko, N., Kostyuk, P., and Verkhratsky, A. (1996) Activation of P2-purino-, alpha 1-adreno and H1-histamine receptors triggers cytoplasmic calcium signalling in cerebellar Purkinje neurons. *Neuroscience* **73** (3), 643-647.
- Kirischuk, et al., 1995: Kirischuk, S., Möller, T., Voitenko, N., Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (1995) ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J.Neurosci.* **15** (12), 7861-7871.
- Kirischuk, et al., 1995: Kirischuk, S., Möller, T., Voitenko, N., Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (1995) ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J.Neurosci.* **15** (12), 7861-7871.
- Kirischuk, et al., 1996: Kirischuk, S., Tuschick, S., Verkhratsky, A., and Kettenmann, H. (1996) Calcium signalling in mouse Bergmann glial cells mediated by alpha1-adrenoreceptors and H1 histamine receptors. *Eur.J.Neurosci.* **8** (6), 1198-1208.
- Kirischuk, et al., 1996: Kirischuk, S., Tuschick, S., Verkhratsky, A., and Kettenmann, H. (1996) Calcium signalling in mouse Bergmann glial cells mediated by alpha1-adrenoreceptors and H1 histamine receptors. *Eur.J.Neurosci.* **8** (6), 1198-1208.
- Kirischuk, S. und Verkhratsky, A., 1996: Kirischuk, S. and Verkhratsky, A. (1996) [Ca²⁺]_i recordings from neural cells in acutely isolated cerebellar slices employing differential loading of the membrane- permeant form of the calcium indicator fura-2. *Pflugers Arch.* **431** (6), 977-983.
- Kiskin, N. et al., 1986: Kiskin, N. I., Krishtal, O. A., and Tsyndrenko, A. Y. (1986) Excitatory amino acid receptors in hippocampal neurons: kainate fails to desensitize them. *Neurosci.Lett.* **63** (3), 225-230.
- Kleckner, N. W. und Dingledine, R., 1988: Kleckner, N. W. and Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241** (4867), 835-837.
- Kleinschmidt, et al., 1987: Kleinschmidt, A., Bear, M. F., and Singer, W. (1987) Blockade of "NMDA" receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten striate cortex. *Science* **238** (4825), 355-358.
- Kloog, Y. und Sokolovsky, M., 1989: Kloog, Y. and Sokolovsky, M. (1989) Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends.Pharmacol.Sci.* **10** (6), 212-214.

- Koh, D. et al., 1995: Koh, D. S., Geiger, J. R., Jonas, P., and Sakmann, B. (1995) Ca(2+)-permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus. *J.Physiol.Lond.* **485** (Pt 2), 383-402.
- Koltchine, V. et al., 1996: Koltchine, V. V., Anantharam, V., Bayley, H., and Treistman, S. N. (1996) Alternative splicing of the NMDAR1 subunit affects modulation by calcium. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **39** (1-2), 99-108.
- Kostyuk, P. und Verkhratsky, A., 1994: Kostyuk, P. and Verkhratsky, A. (1994) Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience* **63** (2), 381-404.
- Kreutzberg, G. W., 1966: Kreutzberg, G. W. (1966) Autoradiographische Untersuchungen über die Beteiligung von Gliazellen an der axonalen Reaktion im Facialiskern. *Acta Neuropath* **7**, 149-161.
- Kriegler, S. und Chiu, S. Y., 1993: Kriegler, S. and Chiu, S. Y. (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J.Neurosci.* **13** (10), 4229-4245.
- Kriegler, S. und Chiu, S. Y., 1993: Kriegler, S. and Chiu, S. Y. (1993) Calcium signaling of glial cells along mammalian axons. *J.Neurosci.* **13** (10), 4229-4245.
- Krnjevic, K. und Schwartz, S., 1967: Krnjevic, K. and Schwartz, S. (1967) Some properties of unresponsive cells in the cerebellar cortex. *Exp.Brain Res.* **3**, 306-319.
- Kuffler, S. et al., 1966: Kuffler, S. W., Nicholls, J. G., and Orkand, R. K. (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J.Neurophysiol.* **29** (4), 768-787.
- Kuhlmann, Krieg et al., 1988: Kuhlmann, Krieg S., Sommer, I., and Schachner, M. (1988) Ultrastructural features of cultured oligodendrocytes expressing stage-specific cell-surface antigens. *Brain Res.* **467** (2), 269-280.
- Lehre, K. P. und Danbolt, N. C., 1998: Lehre, K. P. and Danbolt, N. C. (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J.Neurosci.* **18** (21), 8751-8757.
- Leong, S. K. und Ling, E. A., 1992: Leong, S. K. and Ling, E. A. (1992) Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* **6** (1), 39-47.
- Lerea, L. et al., 1995: Lerea, L. S., Carlson, N. G., and McNamara, J. O. (1995) N-methyl-D-aspartate receptors activate transcription of c-fos and NGFI-A by distinct phospholipase A2-requiring intracellular signaling pathways. *Mol.Pharmacol.* **47** (6), 1119-1125.
- Levenes, et al., 1998: Levenes, C., Daniel, H., and Crepel, F. (1998) Long-term depression of synaptic transmission in the cerebellum: cellular and molecular mechanisms revisited. *Prog.Neurobiol.* **55** (1), 79-91.
- Levison, S. W. und Goldman, J. E., 1993: Levison, S. W. and Goldman, J. E. (1993) Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* **10** (2), 201-212.
- Llano, et al., 1991: Llano, I., Dreesen, J., Kano, M., and Konnerth, A. (1991) Intradendritic release of calcium induced by glutamate in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* **7** (4), 577-583.

- Lopez, Colome AM, Ortega, et al., 1997: Lopez, Colome AM, Ortega, A., Fragoso, G., and Trueba, E. (1997) Excitatory amino acid receptors coupled to the phosphoinositide pathway in Bergmann glia. *Neurochem.Res.* **22** (3), 305-312.
- Lopez, Colome AM, Ortega, et al., 1997: Lopez, Colome AM, Ortega, A., Fragoso, G., and Trueba, E. (1997) Excitatory amino acid receptors coupled to the phosphoinositide pathway in Bergmann glia. *Neurochem.Res.* **22** (3), 305-312.
- Lytton, J. und Nigam, S. K., 1992: Lytton, J. and Nigam, S. K. (1992) Intracellular calcium: molecules and pools. *Curr.Opin.Cell Biol.* **4** (2), 220-226.
- Lytton, et al., 1991: Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M. R. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J.Biol.Chem.* **266** (26), 17067-17071.
- Malcolm, et al., 1996: Malcolm, C., Grieve, A., Ritchie, L., Schousboe, A., and Griffiths, R. (1996) NMDA receptor-mediated cGMP synthesis in primary cultures of mouse cerebellar granule cells appears to involve neuron-astrocyte communication with NO operating as the intercellular messenger. *J.Neurosci.Res.* **45** (2), 129-142.
- Masaki, et al., 1994: Masaki, T., Vane, J. R., and Vanhoutte, P. M. (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol.Rev.* **46** (2), 137-142.
- Masu, et al., 1991: Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349** (6312), 760-765.
- Mathern, G. et al., 1998: Mathern, G. W., Pretorius, J. K., Kornblum, H. I., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J. P., Chimelli, L., Born, D. E., Fried, I., Sakamoto, A. C., Assirati, J. A., Peacock, W. J., Ojemann, G. A., and Adelson, P. D. (1998) Altered hippocampal kainate-receptor mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Neurobiol.Dis.* **5** (3), 151-176.
- Mayer, M. L. und Westbrook, G. L., 1987: Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog.Neurobiol.* **28** (3), 197-276.
- Miyawaki, et al., 1997: Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin [see comments]. *Nature* **388** (6645), 882-887.
- Montal, M., 1998: Montal, M. (1998) Mitochondria, glutamate neurotoxicity and the death cascade. *Biochim.Biophys.Acta* **1366** (1-2), 113-126.
- Monyer, et al., 1991: Monyer, H., Seeburg, P. H., and Wisden, W. (1991) Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* **6** (5), 799-810.
- Moroni, et al., 1997: Moroni, F., Lombardi, G., Thomsen, C., Leonardi, P., Attucci, S., Peruginelli, F., Torregrossa, S. A., Pellegrini, Giampietro DE, Luneia, R., and Pellicciari, R. (1997) Pharmacological characterization of 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **281** (2), 721-729.
- Müller, et al., 1994: Müller, T., Fritschy, J. M., Grosche, J., Pratt, G. D., Mohler, H., and Kettenmann, H. (1994) Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J.Neurosci.* **14** (5 Pt 1), 2503-2514.

- Müller, et al., 1993: Müller, T., Grosche, J., Ohlemeyer, C., and Kettenmann, H. (1993) NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. *Neuroreport*. **4** (6), 671-674.
- Müller, et al., 1993: Müller, T., Grosche, J., Ohlemeyer, C., and Kettenmann, H. (1993) NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. *Neuroreport*. **4** (6), 671-674.
- Müller, et al., 1992: Müller, T., Möller, T., Berger, T., Schnitzer, J., and Kettenmann, H. (1992) Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium- channel blockade in Bergmann glial cells [published erratum appears in *Science* 1992 Aug 28;257(5074):1190]. *Science* **256** (5063), 1563-1566.
- Müller, et al., 1992: Müller, T., Möller, T., Berger, T., Schnitzer, J., and Kettenmann, H. (1992) Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium- channel blockade in Bergmann glial cells [published erratum appears in *Science* 1992 Aug 28;257(5074):1190]. *Science* **256** (5063), 1563-1566.
- Müller, et al., 1996: Müller, T., Möller, T., Neuhaus, J., and Kettenmann, H. (1996) Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia* **17** (4), 274-284.
- Newman, E. A. und Zahs, K. R., 1997: Newman, E. A. and Zahs, K. R. (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science* **275** (5301), 844-847.
- Newman, E. A. und Zahs, K. R., 1998: Newman, E. A. and Zahs, K. R. (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J.Neurosci.* **18** (11), 4022-4028.
- Ohlemeyer, C., 1996: Ohlemeyer, C. (1996) Kalziumerhöhung in Gliazellen durch elektrische Stimulation in der jungen Maus., Rubrecht-Karl-Universität Heidelberg.
- Olney, J. W., 1994: Olney, J. W. (1994) Neurotoxicity of NMDA receptor antagonists: an overview. *Psychopharmacol.Bull.* **30** (4), 533-540.
- Olney, J. W., 1994: Olney, J. W. (1994) New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J.Neural Transm.Suppl.* **43**, 47-51.
- Orkand, R. et al., 1966: Orkand, R. K., Nicholls, J. G., and Kuffler, S. W. (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J.Neurophysiol.* **29** (4), 788-806.
- Peng, et al., 1993: Peng, L., Hertz, L., Huang, R., Sonnewald, U., Petersen, S. B., Westergaard, N., Larsson, O., and Schousboe, A. (1993) Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Dev.Neurosci.* **15** (3-5), 367-377.
- Pozzan, et al., 1994: Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol.Rev.* **74** (3), 595-636.
- Privat, et al., 1995: Privat, A., Gimenez-Ribota, M., and Ridet, J.-L. (1995) Morphology of astrocytes., 3-22. New York, Oxford University Press.
- Reichenbach, et al., 1995: Reichenbach, A., Siegel, A., Rickmann, M., Wolff, J. R., Noone, D., and Robinson, S. R. (1995) Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J.Hirnforsch.* **36** (4), 509-517.

- Rio-Hortega P del., 1921: Rio-Hortega P del. (1921) El tercer elemento de los centros nerviosos. Histogenesis y evolucion normal; exodo y distribution regional de la microglia. Mem R Soc Espan d Hist Nat **11**, 213-267.
- Ripellino, J. et al., 1998: Ripellino, J. A., Neve, R. L., and Howe, J. R. (1998) Expression and heteromeric interactions of non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits in the developing and adult cerebellum. Neuroscience **82** (2), 485-497.
- Risau, W. und Wolburg, H., 1990: Risau, W. and Wolburg, H. (1990) Development of the blood-brain barrier [see comments]. Trends.Neurosci. **13** (5), 174-178.
- Rison, R. A. und Stanton, P. K., 1995: Rison, R. A. and Stanton, P. K. (1995) Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors: foundations of memory and neurologic disease? [published erratum appears in Neurosci Biobehav Rev 1996 Summer;20(2):I]. Neurosci.Biobehav.Rev. **19** (4), 533-552.
- Rubanyi, G. M. und Polokoff, M. A., 1994: Rubanyi, G. M. and Polokoff, M. A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. Pharmacol.Rev. **46** (3), 325-415.
- Sakurai, et al., 1990: Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor [see comments]. Nature **348** (6303), 732-735.
- Salter, M. W. und Hicks, J. L., 1994: Salter, M. W. and Hicks, J. L. (1994) ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord. J.Neurosci. **14** (3 Pt 2), 1563-1575.
- Schousboe, et al., 1997: Schousboe, A., Sonnewald, U., Civenni, G., and Gegelashvili, G. (1997) Role of astrocytes in glutamate homeostasis. Implications for excitotoxicity. Adv.Exp.Med.Biol. **429**, 195-206.
- Schousboe, et al., 1977: Schousboe, A., Svenneby, G., and Hertz, L. (1977) Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. J.Neurochem. **29** (6), 999-1005.
- Schousboe, et al., 1977: Schousboe, A., Svenneby, G., and Hertz, L. (1977) Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. J.Neurochem. **29** (6), 999-1005.
- Schwab, M. E. und Bandtlow, C. E., 1994: Schwab, M. E. and Bandtlow, C. E. (1994) Neurobiology. Inhibitory influences [news]. Nature **371** (6499), 658-659.
- Schwab, M. et al., 1993: Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P., and Bandtlow, C. E. (1993) Inhibitors of neurite growth. Annu.Rev.Neurosci. **16**, 565-595.
- Schwab, M. et al., 1993: Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P., and Bandtlow, C. E. (1993) Inhibitors of neurite growth. Annu.Rev.Neurosci. **16**, 565-595.
- Schwartz, J. et al., 1991: Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M., Pollard, H., and Ruat, M. (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiol.Rev. **71** (1), 1-51.

- Sekiyama, et al., 1996: Sekiyama, N., Hayashi, Y., Nakanishi, S., Jane, D. E., Tse, H. W., Birse, E. F., and Watkins, J. C. (1996) Structure-activity relationships of new agonists and antagonists of different metabotropic glutamate receptor subtypes. *Br.J.Pharmacol.* **117** (7), 1493-1503.
- Shao, Y. und McCarthy, K. D., 1994: Shao, Y. and McCarthy, K. D. (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia* **11** (2), 147-155.
- Shao, Y. und McCarthy, K. D., 1997: Shao, Y. and McCarthy, K. D. (1997) Responses of Bergmann glia and granule neurons in situ to N-methyl-D-aspartate, norepinephrine, and high potassium. *J.Neurochem.* **68** (6), 2405-2411.
- Shiga, et al., 1983: Shiga, T., Ichikawa, M., and Hirata, Y. (1983) A Golgi study of Bergmann glial cells in developing rat cerebellum. *Anat.Embryol.Berl.* **167** (2), 191-201.
- Shiga, et al., 1983: Shiga, T., Ichikawa, M., and Hirata, Y. (1983) Spatial and temporal pattern of postnatal proliferation of Bergmann glial cells in rat cerebellum: an autoradiographic study. *Anat.Embryol.Berl.* **167** (2), 203-211.
- Siegel, et al., 1991: Siegel, A., Reichenbach, A., Hanke, S., Senitz, D., Brauer, K., and Smith-TG, Jr. (1991) Comparative morphometry of Bergmann glial (Golgi epithelial) cells. A Golgi study. *Anat.Embryol.Berl.* **183** (6), 605-612.
- Simpson, P. et al., 1998: Simpson, P. B., Mehotra, S., Langley, D., Sheppard, C. A., and Russell, J. T. (1998) Specialized distributions of mitochondria and endoplasmic reticulum proteins define Ca²⁺ wave amplification sites in cultured astrocytes. *J.Neurosci.Res.* **52** (6), 672-683.
- Sommer, et al., 1990: Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249** (4976), 1580-1585.
- Sommer, et al., 1991: Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* **67** (1), 11-19.
- Sommer, I. und Schachner, M., 1981: Sommer, I. and Schachner, M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev.Biol.* **83** (2), 311-327.
- Sorg, et al., 1997: Sorg, O., Horn, T. F., Yu, N., Gruol, D. L., and Bloom, F. E. (1997) Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. *Mol.Med.* **3** (7), 431-440.
- Stone, T. W., 1981: Stone, T. W. (1981) Differential blockade of ATP, noradrenaline and electrically evoked contractions of the rat vas deferens by nifedipine. *Eur.J.Pharmacol.* **74** (4), 373-376.
- Storch, M. und Lassmann, H., 1997: Storch, M. and Lassmann, H. (1997) Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr.Opin.Neurol.* **10** (3), 186-192.
- Streb, et al., 1983: Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J., and Schulz, I. (1983) Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306** (5938), 67-69.

- Streit, W. et al., 1988: Streit, W. J., Graeber, M. B., and Kreutzberg, G. W. (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* **1** (5), 301-307.
- Streit, W. et al., 1988: Streit, W. J., Graeber, M. B., and Kreutzberg, G. W. (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* **1** (5), 301-307.
- Streit, W. J. und Kreutzberg, G. W., 1987: Streit, W. J. and Kreutzberg, G. W. (1987) Lectin binding by resting and reactive microglia. *J.Neurocytol.* **16** (2), 249-260.
- Swanson, G. et al., 1996: Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., and Cull, Candy SG. (1996) Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J.Physiol.Lond.* **492** (Pt 1), 129-142.
- Takechi, et al., 1998: Takechi, H., Eilers, J., and Konnerth, A. (1998) A new class of synaptic response involving calcium release in dendritic spines. *Nature* **396** (6713), 757-760.
- Tang, C. et al., 1989: Tang, C. M., Dichter, M., and Morad, M. (1989) Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons. *Science* **243** (4897), 1474-1477.
- Tempia, et al., 1996: Tempia, F., Kano, M., Schneggenburger, R., Schirra, C., Garaschuk, O., Plant, T., and Konnerth, A. (1996) Fractional calcium current through neuronal AMPA-receptor channels with a low calcium permeability. *J.Neurosci.* **16** (2), 456-466.
- Thastrup, et al., 1990: Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., and Dawson, A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87** (7), 2466-2470.
- Toescu, E. et al., 1998: Toescu, E. C., Möller, T., Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (1998) Long-term activation of capacitative Ca^{2+} entry in mouse microglial cells. *Neuroscience* **86** (3), 925-935.
- Trotti, et al., 1998: Trotti, D., Danbolt, N. C., and Volterra, A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends.Pharmacol.Sci.* **19** (8), 328-334.
- Trussell, L. O. und Fischbach, G. D., 1989: Trussell, L. O. and Fischbach, G. D. (1989) Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. *Neuron* **3** (2), 209-218.
- Trussell, L. et al., 1988: Trussell, L. O., Thio, L. L., Zorumski, C. F., and Fischbach, G. D. (1988) Rapid desensitization of glutamate receptors in vertebrate central neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85** (12), 4562-4566.
- Turner, A. J. und Murphy, L. J., 1996: Turner, A. J. and Murphy, L. J. (1996) Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochem.Pharmacol.* **51** (2), 91-102.
- Tuschick, S., 1997: Tuschick, S. (1997) Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale von Bergmann Gliazellen aus dem Kleinhirn der Maus., Freie Universität berlin.
- Tuschick, S., 1997: Tuschick, S. (1997) Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale von Bergmann Gliazellen aus dem Kleinhirn der Maus., Freie Universität berlin.

- Tuschick, et al., 1997: Tuschick, S., Kirischuk, S., Kirchhoff, F., Liefeldt, L., Paul, M., Verkhratsky, A., and Kettenmann, H. (1997) Bergmann glial cells in situ express endothelinB receptors linked to cytoplasmic calcium signals. *Cell Calcium* **21** (6), 409-419.
- Tuschick, et al., 1997: Tuschick, S., Kirischuk, S., Kirchhoff, F., Liefeldt, L., Paul, M., Verkhratsky, A., and Kettenmann, H. (1997) Bergmann glial cells in situ express endothelinB receptors linked to cytoplasmic calcium signals. *Cell Calcium* **21** (6), 409-419.
- Vandenberg, R. J., 1998: Vandenberg, R. J. (1998) Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **25** (6), 393-400.
- Verdoorn, T. et al., 1991: Verdoorn, T. A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* **252** (5013), 1715-1718.
- Verkhratsky, A. und Kettenmann, H., 1996: Verkhratsky, A. and Kettenmann, H. (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends.Neurosci.* **19** (8), 346-352.
- Verkhratsky, A. und Kettenmann, H., 1996: Verkhratsky, A. and Kettenmann, H. (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends.Neurosci.* **19** (8), 346-352.
- Verkhratsky, et al., 1998: Verkhratsky, A., Orkand, R. K., and Kettenmann, H. (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol.Rev.* **78** (1), 99-141.
- Virchow, R., 1856: Virchow, R. (1856) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin.* Hamm, Frankfurt a. M.
- Wada, et al., 1991: Wada, H., Inagaki, N., Itowi, N., and Yamatodani, A. (1991) Histaminergic neuron system in the brain: distribution and possible functions. *Brain Res.Bull.* **27** (3-4), 367-370.
- Wada, et al., 1991: Wada, H., Inagaki, N., Itowi, N., and Yamatodani, A. (1991) Histaminergic neuron system: morphological features and possible functions. *Agents Actions Suppl.* **33**, 11-27.
- Wada, et al., 1991: Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A., and Watanabe, T. (1991) Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? *Trends.Neurosci.* **14** (9), 415-418.
- Walz, W., 1987: Walz, W. (1987) Swelling and potassium uptake in cultured astrocytes. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **65** (5), 1051-1057.
- Wedler, F. et al., 1994: Wedler, F. C., Vichnin, M. C., Ley, B. W., Tholey, G., Ledig, M., and Copin, J. C. (1994) Effects of Ca(II) ions on Mn(II) dynamics in chick glia and rat astrocytes: potential regulation of glutamine synthetase. *Neurochem.Res.* **19** (2), 145-151.
- Westergaard, et al., 1995: Westergaard, N., Sonnewald, U., and Schousboe, A. (1995) Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev.Neurosci.* **17** (4), 203-211.
- Whittenburg., 1996: Whittenburg. (1996) P2-purinoceptor antagonists: II blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidase by compounds related to Evans blue and trypan blue. *Naunyn-Schmied.Arch.Pharmacol.* **354**, 491.

Xu, et al., 1994: Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., and Yanagisawa, M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78** (3), 473-485.

Yanagisawa, et al., 1988: Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells [see comments]. *Nature* **332** (6163), 411-415.

Zhou, et al., 1997: Zhou, Z., Champagnat, J., and Poon, C. S. (1997) Phasic and long-term depression in brainstem nucleus tractus solitarius neurons: differing roles of AMPA receptor desensitization. *J.Neurosci.* **17** (14), 5349-5356.

Zimmermann, H., 1994: Zimmermann, H. (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends.Neurosci.* **17** (10), 420-4(6).

: